

Untersuchungen zur B-Zell-Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen
Fakultät IV – Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Kristina Doser aus Metten
Februar 2011

Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. M. Edinger

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. F. Kees
	1. Gutachter (1. Prüfer):	Prof. Dr. R. Seifert
	2. Gutachter (2. Prüfer):	Prof. Dr. M. Edinger
	3. Prüfer:	Prof. Dr. R. Warth

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
8-MOP	8-Methoxypsoralen
Abb.	Abbildung
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
ad	auffüllen auf
APC	Allophycocyanin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
APC	Antigen presenting cell (Antigenpräsentierende Zelle)
BCR	B cell receptor (B-Zell-Rezeptor)
BSA	Bovine serum albumin
BZD	B-Zell-Depletiert
cAMP	zyklisches (cyclic) AMP
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester (Fluoreszenzfarbstoff)
c-kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
CLP	Common lymphoid progenitor (lymphoide Progenitorzelle)
CMP	Common myeloide progenitor (myeloische Progenitorzelle)
CSA	Cyclosporin A (Immunsuppressivum)
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte (zytotoxische T-Lymphozyten)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
DC	Dendritic cell (Dendritische Zelle)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBF	Early B cell factor
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
<i>et al.</i>	et alii/alia
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrische Messmethode)
FasL	Fas-Ligand
FCS	Foetal calf serum (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
FoxP3	Forkhead box P3 (Transkriptionsfaktor)
FSC	Forward scatter
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)

GFP	Green fluorescent protein
GITR	Glucocorticoid induced tumor necrosis factor
GVHD	Graft-versus-host disease (Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung)
GVL	Graft-versus-leukemia (Transplantat-gegen-Leukämie)
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HE	Homöostatische Expansion
HLA	Human leucocyte antigen
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSC	Hematopoietic stem cell (Hämatopoetische Stammzelle)
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HvG	Host-versus-graft (Empfänger-gegen-Transplantat)
ICER	Inducible cAMP early repressor
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEX	immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
ITAM	immunoreceptor tyrosine based activation motif
iTreg	induzierte regulatorische T-Zellen
KM	Knochenmark
L	Ligand
LAG3	Lymphocyte activation gene 3
LPS	Lipopolysaccharid
LT-HSC	Long-term-HSC (Langzeit-repopulierende Stammzellen)
m	Milli (10^{-3})
MACS	Magnetic activated cell sorting (Magnetische Zellseparation)
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
miHA	Minor histocompatibility antigen (Nebenhistokompatibilitätsantigen)
min	Minute
ml	Milliliter
MLR	Mixed lymphocyte reaction (gemischte Lymphozytenkultur)
MNZ	mononukleäre Zellen
MPP	Multipotent progenitors (multipotente Vorläuferzellen)
MTX	Methotrexat
MZ	Marginalzone
n	Nano (10^{-9})

nd	not determined (nicht bestimmt)
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK-Zelle	Natural killer cell (natürliche Killer-Zelle)
nTreg-Zelle	natürliche Treg-Zelle
OD	Optical density (optische Dichte)
OVA	Ovalbumin
p	Piko (10^{-12})
PALS	Periarteriolare lymphoide Scheide
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7 (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PerCP	Peridinin Chlorophyll-a Protein (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PI	Propidiumiodid
R	Rezeptor
RAG	recombinase-activating gene
RIC	reduced intensity conditioning
RT	Raumtemperatur
RTE	recent thymic emigrants
SCF	Stem cell factor (Stammzellfaktor)
SL	Surrogate light chain (Ersatzleichte-Kette)
SSC	Side scatter
ST-HSC	Short-term-HSC (Kurzzeit-repopulierende Stammzellen)
Tconv-Zelle	konventionelle (conventional) T-Zelle
TCR	T cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
TD	Thymus dependent (Thymus abhängig)
TdT	Terminal desoxynucleotidyl transferase (Terminale Desoxynukleotidyl-transferase)
TGF-β	Transforming growth factor β
Th3	T-Helfer-Typ 3 (regulatorische T-Zelle)
Th-Zelle	T-Helferzelle
TI	Thymus independent (Thymus unabhängig)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	Tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
TNFR	TNF-Rezeptor
TNP	Trinitrophenyl
Tr1-Zelle	regulatorische T-Zelle Typ1

TREC	TCR rearrangement excision circles
Treg-Zelle	regulatorische T-Zelle
Tx	Transplantation
TZD	T-Zell-Depletiert
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
μ	Mikro (10^{-6})

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Die Entwicklung und Reifung von B-Zellen.....	3
1.2.1 Die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark.....	3
1.2.1.1 Stadien der B-Zell-Entwicklung	5
1.2.2 Reifung der B-Zellen in der Peripherie	7
1.3 Allogene Stammzelltransplantation	7
1.3.1 Graft-versus-Host-Disease (GVHD)	9
1.3.1.1 Akute GVHD	10
1.3.1.2 Strategien zur Prophylaxe und Therapie der GVHD	11
1.3.2 Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation	13
1.4 Regulatorische T-Zellen	15
1.4.1 Natürliche regulatorische T-Zellen.....	16
1.4.1.1 Mechanismus der Suppression durch nTreg	18
1.4.2 Induzierte regulatorische T-Zellen	19
1.4.3 Bedeutung der nTreg in der experimentellen GVHD	20
1.5 Zielsetzung.....	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.2 Antikörper für FACS	23
2.1.3 Antikörper für ELISA	24
2.1.4 Micro Beads für die magnetische Zellseparation	24
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.6 Geräte.....	25
2.1.7 Mausstämme	26
2.1.8 Zelllinien.....	26
2.1.9 Medien, Puffer und Lösungen	26
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 Zellzählung.....	28
2.2.2 Isolierung muriner Primärzellen.....	29
2.2.2.1 Isolierung von Knochenmarkzellen.....	29

2.2.2.2	T-Zell-Depletion von murinen Knochenmarkzellen	29
2.2.2.3	T- und B-Zell-Depletion von murinen Knochenmarkzellen.....	30
2.2.2.4	Isolierung reifer CD19 ⁺ B-Zellen aus murinen Knochenmarkzellen mittels kombinierter magnetischer und durchflusszytometrischer Zell-separation.....	30
2.2.2.5	Isolierung von murinen Milzzellen	31
2.2.2.6	Isolierung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg und CD4 ⁺ CD25 ⁻ Tconv Zellen aus der Milz mittels kombinierter magnetischer und durchflusszytometrischer Zellseparation.....	32
2.2.3	Durchflusszytometrische Messungen.....	32
2.2.3.1	Analyse von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen	32
2.2.3.2	Oberflächenfärbung für FACS Analyse	33
2.2.3.3	FoxP3 Färbung	34
2.2.4	Kultivierung der murinen Stromazelllinie ST-2.....	34
2.2.5	Kultivierung von Knochenmarkzellen auf einer ST-2 Stromazelllinie	35
2.2.6	Allogene Knochenmarktransplantation im murinen Modell	35
2.2.6.1	Konditionierung	35
2.2.6.2	Transplantation	35
2.2.6.3	Bewertung der GVHD.....	36
2.2.7	Venöse Blutabnahme.....	36
2.2.8	Immunisierung mit TNP-OVA (T-Zell-abhängige Antigene)	37
2.2.8.1	Verabreichung der Antigene.....	37
2.2.9	ELISA.....	37
2.2.9.1	Blutentnahme zur Serumgewinnung.....	37
2.2.9.2	Sandwich-ELISA zum Nachweis von murinem IgG und IgM.....	37
2.2.9.3	Antigen (TNP)- spezifischer Sandwich-ELISA	38
2.2.10	Histologie	38
2.2.11	Einbetten von Organen	38
2.2.12	Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung.....	39
2.2.13	Statistik	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Allogene Knochenmarktransplantation im murinen Modell	41
3.1.1	Isolierung und Charakterisierung der transplantierten Zell-populationen	41
3.1.2	Allogenes KMT Modell	44
3.1.3	Durchflusszytometrische Analyse (FACS) von peripherem Blut, Milz und KM von Empfängertieren nach allogener Knochen-marktransplantation	47
3.2	Untersuchungen zur Funktionalität der B-Zellen.....	51
3.2.1	Induktion einer humoralen Immunantwort gegen das T-Zell-abhängige Antigen TNP-OVA.....	51

3.2.2	Bestimmung der Gesamt-IgM und IgG Spiegel im Serum von Mäusen nach allogener KMT und Immunisierung mit TNP-OVA	52
3.2.3	Bestimmung der humoralen Immunantwort nach Immunisierung mit dem T-Zell-abhängigen Hapten-Träger-Konjugat TNP-OVA	53
3.3	Initiale Prozesse der B-Zell-Rekonstitution nach allogener KMT	54
3.3.1	Transplantatzusammensetzung	55
3.3.2	Monitoring der B- und T-Zell-Rekonstitution früh nach allogener KMT mittels FACS-Analyse von Milz und KM der Empfänger-tiere	56
3.3.3	Auswirkungen einer zeitverzögert induzierten GVHD auf das bereits rekonstituierte B-Zell-Kompartiment	64
3.3.4	Durchflusszytometrische Analyse von peripherem Blut, Milz und Knochenmark von BALB/c Empfängertieren nach allogener KMT und zeitverzögerter Tconv Gabe	66
3.4	Effekte der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF auf die B-Zell-Rekonstitution nach allogener KMT	73
3.4.1	Verlauf der B-Zell-Rekonstitution im kompetitiven KMT-Modell	76
3.4.2	FACS- Analysen von Milz und Knochenmark der Empfänger-tiere nach Transfer des gemischten KM	78
3.5	Untersuchungen zum B-Zell-Rekonstitutionspotential von KM aus GVHD-Tieren	81
3.5.1	Bestimmung des Rekonstitutionspotentials <i>in vitro</i>	81
3.5.1.1	Etablierung des <i>in vitro</i> Kultursystems mit ST-2 Stromazellen	81
3.5.1.2	B-Zell-Rekonstitution <i>in vitro</i> aus KM von Tieren mit und ohne GVHD	82
3.6	Bestimmung des B-Zell-Rekonstitutionspotentials <i>in vivo</i> im KM-Retransplantationsmodell	83
3.6.1.1	Verlauf der B- und T-Zell-Rekonstitution in peripherem Blut, KM und Milz sekundärer Empfängertiere	85
4	Diskussion	89
5	Zusammenfassung und Ausblick	103
6	Summary	106
7	Literaturverzeichnis	109
8	Publikationen	137
9	Lebenslauf	139
10	Danksagung	141
11	Eidesstattliche Erklärung	142

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Hauptaufgabe des Immunsystems ist die Erhaltung der Integrität höher entwickelter Organismen. Neben den physikalisch-chemischen Eigenschaften innerer und äußerer Körperoberflächen, die ein Eindringen potentiell pathogener Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen, Viren und Parasiten weitgehend verhindern, trägt insbesondere ein komplexes Netzwerk spezialisierter Abwehrzellen zum Schutz vor Infektionserregern bei. Die zellulären Komponenten des Immunsystems von Säugern werden vereinfachend in Zellen des angeborenen (unspezifischen) und des adaptiven (spezifischen) Immunsystems klassifiziert (1). Zu den Zellen des unspezifischen Immunsystems zählen insbesondere Granulozyten und das Monozyten/Makrophagensystem. Diese Zellen exprimieren Rezeptoren für konservierte Molekülstrukturen mikrobieller Erreger, die zusammenfassend als „pattern recognition Rezeptoren“ (PRR) bezeichnet werden (2). Ihre Rekrutierung und Funktion wird durch Chemokine, Zytokine und aktivierte Komplementfaktoren reguliert, während ihre Hauptaufgabe in der Phagozytose der Mikroorganismen besteht. Durch deren Degradation und die Prozessierung von Proteinen insbesondere in Monozyten und den verwandten (bzw. sich daraus entwickelnden) dendritischen Zellen kommt es zur Präsentation von Peptidfragmenten in MHC-Molekülen und damit zur Initiierung einer spezifischen Immunreaktion gegen diese Fremdartigkeitsantigene. Träger der spezifischen Immunreaktion sind die B- und T-Lymphozyten. Zentrale Voraussetzungen für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer adaptiven Immunreaktion sind die Fähigkeit dieser Zellen, „fremd“ von „selbst“ zu unterscheiden, das Vorhandensein genetischer Flexibilität, um auf eine Vielzahl potentieller Fremdartigkeitsantigene spezifisch reagieren zu können („Lernen“) und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses nach Erstkontakt mit einem Fremdartigkeitsantigen (3, 4). T-Lymphozyten entwickeln sich aus knochenmarkstämmigen Vorläuferzellen im Thymus und werden dort bezüglich der Erkennung von MHC-Molekülen positiv selektioniert (Selbst-Restriktion). Vorläufer-T-Zellen, die nach erfolgreicher Rekombination ihrer VDJ-Gensegmente einen T-Zell-Rezeptor (TCR) auf der Oberfläche exprimieren und mit MHC Klasse I Molekülen interagieren, entwickeln sich zu CD8⁺ T-Lymphozyten, während T-Zellen die MHC Klasse II Moleküle erkennen zu CD4⁺ T-Zellen heranreifen. Nach Abschluss der Positivselektion in der Thymusrinde werden solche T-Zellen, die mit hoher Avidität gegen Selbst-MHC und die darin präsentierten Autoantigene reagieren, im Thymusmark von spezialisierten dendritischen Zellen negativ selektioniert, d.h. sie gehen in Apoptose und verlassen nie den Thymus. Durch diese zentralen Toleranzmechanismen wird in der Regel

verhindert, dass es in der Peripherie zu schweren Autoimmunreaktionen kommt. Exportiert wird hingegen ein breites Repertoire an T-Zellen, das mit seinen diversen TCR mit Selbst-MHC interagieren kann aber nicht auf Autoantigene reagiert. Treffen diese T-Zellen in der Peripherie auf antigenpräsentierende Zellen (APC), die Fremdpeptide im MHC präsentieren, werden die reagiblen T-Zellen aktiviert. Es kommt zur klonalen Expansion und zu ihrer Differenzierung in Effektorzellen sowie zur Entwicklung einer Subpopulation von langlebigen Gedächtniszellen. Die Effektorfunktion der mit MHC Klasse II interagierenden $CD4^+$ T-Helfer-Zellen besteht hauptsächlich in der Sekretion proinflammatorischer Zytokine, während mit MHC Klasse I interagierende $CD8^+$ T-Zellen neben der Zytokinsekretion vor allem zytotoxische Eigenschaften besitzen und infizierte Zellen z.B. mittels Perforin und Granzyme zerstören (zytotoxische T-Zellen, CLT) (5, 6).

Die humorale Immunität wird von den B-Zellen und den aus ihnen entstehenden Plasmazellen vermittelt. B-Zellen tragen auf ihren Zelloberflächen membrangebundene Immunglobuline als Antigenrezeptoren (BCR). Antikörper sind Y-förmige Strukturen mit zwei Antigen-Bindungsstellen. Sie bestehen aus zwei identischen leichten (L) und zwei identischen schweren (H) Ketten, welche durch nicht-kovalente Wechselwirkungen und kovalente Bindungen (Disulfidbrücken) miteinander verbunden sind. Sie bilden zusammen eine konstante und zwei identische variable Regionen des Antikörpers. Die konstanten Regionen bestimmen die Antikörperklasse. In Säugetieren gibt es 5 verschiedene Antikörperklassen (IgG, IgM, IgD, IgA, IgE), wobei der auf B-Zellen membranständige BCR zunächst aus IgM und IgD Molekülen besteht, nach Aktivierung und Reifung der B-Zelle aus IgG Molekülen. Bei der B-Zell-Aktivierung unterscheidet man zwischen T-Zell-abhängiger (*T-cell dependent*, TD) und T-Zell-unabhängiger (*T-cell independent*, TI) Aktivierung (7, 8). Bei TI-Antigenen handelt es sich z.B. um Polypeptide, Lipopolysaccharide und Nukleinsäuren, die mehrere BCR auf der Oberfläche miteinander vernetzt und dadurch eine T-Zell-unabhängige B-Zell-Aktivierung herbeiführen. In der Folge kommt es zur Bildung kurzlebiger Plasmazellen, die hauptsächlich IgM sezernieren, aber keinen Klassenwechsel (*class switch*) vollziehen. Ebenso wenig werden langlebige Gedächtniszellen generiert. Im Unterschied hierzu wird bei T-Zell-abhängigen B-Zell-Reaktionen, z.B. zur Bildung von Antikörpern gegen Protein- und Peptidantigene, die Hilfe von $CD4^+$ T-Zellen benötigt. B-Zellen binden hierbei BCR gebundene Proteine, die nach Internalisierung prozessiert werden und anschließend in Form von MHC II-Peptid Komplexen auf der Zelloberfläche von T-Zellen präsentiert werden. Antigen-spezifische T-Zellen werden hierdurch aktiviert und exprimieren ihrerseits kostimulatorische Moleküle wie CD40L (CD40 Ligand), der mit dem CD40 Molekül auf B-Zellen interagiert und zur Stimulation und Proliferation der B-Zelle führt. Unterstützt wird die Proliferation und der nachfolgende Antikörperklassenwechsel zusätzlich durch die von aktivierten T-Zellen sezernierten Zytokine (z.B. IL-4, IL-13 u.a.) (9, 10). In der Folge kommt

es zur Differenzierung der stimulierten B-Zelle in eine antikörperproduzierenden Plasmazelle, während eine Subpopulation des B-Zell-Klons zur Gedächtniszelle ausreift (10, 11). Neben ihrer Funktion als Antikörperproduzenten scheinen B-Zellen Immunreaktionen zusätzlich auf vielfältige Weise zu beeinflussen. Hierzu zählt u.a. ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation. Im Unterschied zu anderen APC nehmen B-Zellen Antigene spezifisch über ihren BCR auf (12). Diese werden internalisiert, prozessiert und anschließend über MHC II mittels Kreuzpräsentation (*cross presentation*) aber auch über MHC I präsentiert, so dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen stimuliert werden können. Durch ihre eigene Zytokin- und Chemokinsekretion können sie wiederum die Art und Stärke der T-Zell-Antwort modulieren und das Rekrutment von anderen Zellen beeinflussen. Hierdurch besitzen sie nicht nur immunstimulatorischen Charakter, sondern können je nach Umgebungsbedingung auch immunmodulatorische Funktion ausüben und zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beitragen, z.B. über Mechanismen wie Deletion (13), die Induktion von Anergie (14) oder durch zytokinvermittelte Suppression (15). Wie solche sogenannte regulatorische B-Zellen (Breg) eine Suppression vermitteln ist noch nicht im Detail verstanden. Hauptsächlich wird die Produktion von immunmodulierenden Zytokinen, vor allem IL-10 und TGFβ, diskutiert (16).

1.2 Die Entwicklung und Reifung von B-Zellen

1.2.1 Die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark

Alle blutbildenden Zellen von Säugern entstehen postnatal aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC) im Knochenmark (KM). HSC zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, sich selbst zu replizieren (Selbsterneuerungspotential, *self-renewal*) und in jeglichen hämatopoetischen Zelltyp differenzieren (Multiliniendifferenzierungspotential) zu können, so dass sie den Organismus lebenslang mit allen Blutzellen versorgen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Transplantation von nur einer HSC in letal bestrahlte Mäuse, 10⁹ Zellen der verschiedenen Differenzierungsformen von Blutzellen gebildet werden können. Aufgrund des hohen physiologischen Umsatzes hämatopoetischer Zellen und der fatalen Folgen eines Verlustes oder einer unkontrollierten Expansion des Stammzellpools, muss das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung streng reguliert sein. Die Aufrechterhaltung der HSC und die Regulation ihrer Selbsterneuerung bzw. Differenzierung ist *in vivo* stark abhängig von ihrer speziellen Umgebung, der Stammzellnische. Die Existenz einer Stammzellnische wurde erstmals von Schofield *et al.* (17) vorgeschlagen. Diese Nische ist aus verschiedenen Zelltypen wie Stromazellen, Osteoblasten und Endothelzellen aufgebaut.

Weitere Komponenten sind die extrazelluläre Matrix und lösliche Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren. Die Differenzierung der HSC (**Abb. 1.1**) erfolgt stufenweise und hierarchisch, ausgehend von Langzeit-repopulierenden Stammzellen (*long-term-HSC*, LT-HSC). Diese entwickeln sich über Kurzzeit-repopulierende Stammzellen (*short-time-HSC*, ST-HSC) zu multipotenten Vorläuferzellen (MPP), die nur noch ein eingeschränktes Selbsterneuerungspotential besitzen. Aus diesen Zellen entwickeln sich sowohl liniendeterminierte lymphoide Progenitorzellen (*common lymphoid progenitor*, CLP) als auch liniendeterminierte myeloische Progenitorzellen (*common myeloid progenitor*, CMP). Während sich aus den CLP im Verlauf die T-, B- und NK-Zellen entwickeln, entstehen aus den CMP die verschiedenen Zelltypen der myeloischen Reihe (18).

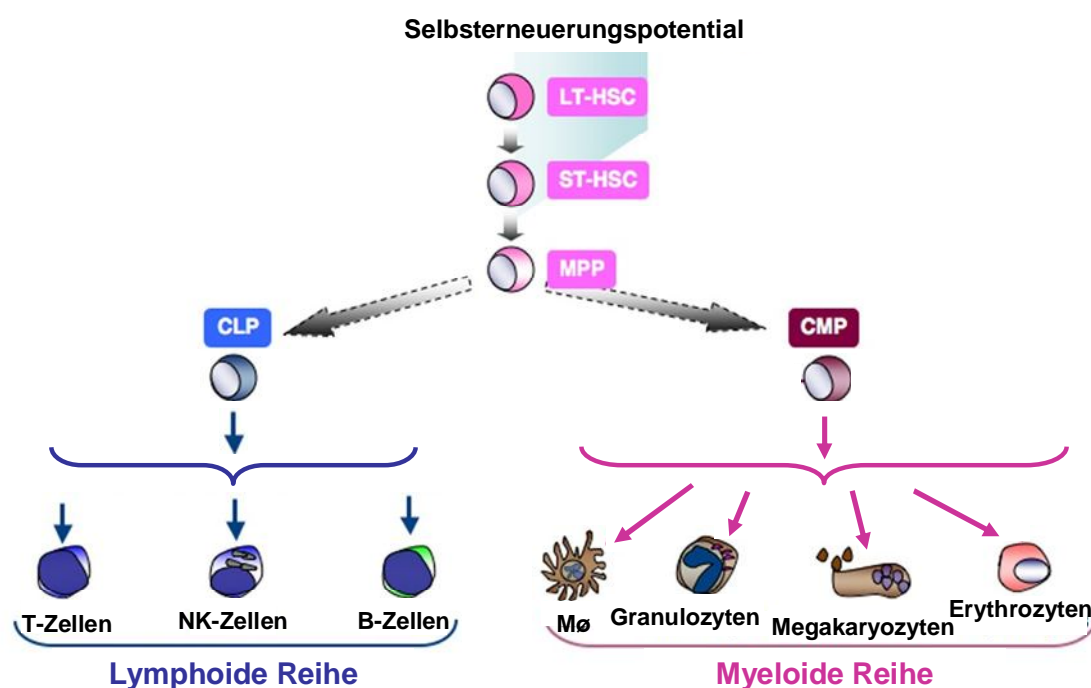


Abb. 1.1: Die Hämatopoetische Kaskade, modifiziert nach Kondo *et al.* (18)

Die Hämatopoese wird u.a. durch die Zytokinproduktion von Zellen der SZ-Nische beeinflusst. Die sezernierten Proteine verändern durch das Binden an spezifische Rezeptoren der HSC und/oder ihrer nachfolgenden Reifestadien die Genexpressionsprofile. Diese Interaktionen fördern die Proliferation und/oder das Überleben der Zellen und induzieren die zelltyp-spezifische Differenzierung. Für die Entwicklung von B-Zell-Vorläuferzellen sind mindestens zwei Zytokinrezeptoren und sechs Transkriptionsfaktoren von zentraler Bedeutung (19-26). Durch die gemeinsame Expression der Transkriptionsfaktoren PU.1 und Ikaros wird in der MPP die Entwicklung hin zur B-Zelle determiniert. Die Expression der Rezeptortyrosinkinase Flt3 (*fms-like tyrosine kinase 3*) wird in der MPP initiiert, was ihre Spezifizierung hin zur CLP fördert und die Entwicklung zur CMP inhibiert (27). In der entstandenen CLP wird die Expression von Flt3 und PU.1 induziert,

wodurch es zur Expression des IL-7R auf deren Oberfläche kommt (28). Nach Stimulation über den IL-7R kommt es zu einer Aktivierung des Faktors E2A, der zusammen mit PU.1 die Expression des Transkriptionsfaktors EBF (*early B cell factor*) reguliert. Abschließend induziert EBF die Expression von Pax-5, was zu einem Block in der Entwicklung anderer hämatopoetischer Linien führt und gleichzeitig die Expression B-Zell-spezifischer Gene verstärkt.

1.2.1.1 Stadien der B-Zell-Entwicklung

Die frühen Stadien der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark können durch die differentielle Expression verschiedener intrazellulärer und oberflächenständiger Marker unterschieden werden (29-31). Bis zum Stadium der reifen B-Zelle durchläuft die Vorläuferzelle im Mikromillieu des Knochenmarks eine Reihe definierter Entwicklungsstadien, welche durch Interaktionen mit Ligandenstrukturen oder Rezeptoren auf Stromazellen sowie durch lösliche Zytokine, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren gesteuert werden. Der für die B-Zell-Entwicklung benötigte Zell-Zell-Kontakt der frühen B-Zellen mit den Stromazellen wird über Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAM) vermittelt. Der Wachstumsfaktor SCF (Stammzellfaktor, *stem cell factor*) liegt sowohl membrangebunden als auch in löslicher Form vor. Der Stammzellfaktor bindet an den Oberflächenrezeptor c-kit (Stammzellfaktorrezeptor, CD117) der B-Vorläuferzellen und das für die frühe B-Zell-Entwicklung benötigte Zytokin IL-7 wird von Stromazellen sezerniert. Zur Klassifizierung der Entwicklungsstadien von B-Zellen werden derzeit noch unterschiedliche Nomenklaturen verwendet. Die in dieser Arbeit verwendete Einteilung der B-Zell-Stadien basiert auf der Nomenklatur von Melchers und Rolink (32). Eine alternative Beschreibung der B-Zell-Stadien basiert auf der schrittweisen Umordnung und Expression der Gensegmente der L- und H-Ketten im Entwicklungsverlauf (33). Durch diese Genrekombinationen wird ein funktionsfähiger B-Zell-Rezeptor generiert, was für das Überleben und die Differenzierung von B-Vorläuferzellen von entscheidender Bedeutung ist. Die Antigenspezifität des Rezeptors wird durch die Verknüpfung der V- (variable), J- (joining) und D- (diversity) Segmente mittels somatischer Rekombination erreicht. Die frühesten Zellen der B-Zelllinie nennt man Pro-B-Zellen ($B220^{+}/CD135^{+}$ (Flt3)/ $CD117$ (c-kit) $^{+}/CD25^{-}$), in denen die somatische Rekombination der Gensegmente für die H-Immunglobulinkette beginnt (34). Die für die VDJ-Rekombination benötigten Enzyme RAG-1 und RAG-2 (*recombinase-activating gen*) sowie die terminale Desoxynukleotidyltransferase (*terminal desoxynucleotidyl transferase*, TdT) können in diesen Zellen intrazellulär nachgewiesen werden (35). Nach Abschluss der DJ_H-Verknüpfung folgt in der späten Pro-B Zell-Phase ($B220^{+}/CD135^{-}$ (Flt3)/ $CD117$ (c-kit) $^{+}/CD25^{-}$) die Anknüpfung eines beliebigen V_H- Segments an die DJ_H- Kasette.

Nach einem produktiven Rearrangement (*in frame*) beginnt die Prä-B-Zell-Phase ($B220^{+}/CD135^{-}$ (Flt3)/ $CD117^{-}$ (c-kit)/ $CD25^{+}$) und die schwere (μ H) Kette von IgM wird synthetisiert. Die schweren Ketten können entweder im Zytoplasma oder zusammen mit der aus den Proteinen $\lambda 5$ - und VpreB bestehenden Ersatzleichtkette (*surrogate light chain*, SL) und den Signalmolekülen $Ig\alpha$ (CD79a) und $Ig\beta$ (CD79b) als Teil der Prä-B-Zell-Rezeptors (Prä-BCR) auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (36). Nur wenn es der Zelle gelingt, zusammen mit der SL-Kette einen funktionsfähigen Prä-BCR auf der Oberfläche zu präsentieren, beginnen die großen Prä-B-Zellen (nach Stimulierung des Prä-BCR) zu proliferieren. In den so entstandenen kleinen Prä-B-Zellen beginnt nun das Rearrangement der leichten Kette, wobei die V-J Gensegmente der leichten Kette im Igk- oder Ig λ -Lokus rearrangiert werden. Meist werden zuerst die Elemente im Igk-Lokus rekombiniert und nur wenn keine produktive leichte Kette gebildet werden kann, werden die Elemente im Ig λ -Lokus rekombiniert (37, 38). Nach Abschluss des Rearrangements bildet die leichte Kette zusammen mit der schweren Kette des IgM Isotyps einen BCR auf der Zelloberfläche und weitere Rekombinationsprozesse werden gestoppt. Mit dem Erscheinen des membranständigen IgM auf der Oberfläche werden diese Zellen als unreife B-Zellen bezeichnet ($B220^{+}/CD135^{-}$ (Flt3)/ $CD117^{-}$ (c-kit)/ $CD25^{-}/IgM^{+}/IgD^{-}$). Diese unreifen B-Zellen werden auf Selbst-Toleranz negativ selektiert, d.h. selbstreaktive Zellen werden durch Apoptose eliminiert oder in einen anergen Zustand versetzt. Darüber hinaus kann es zur sogenannten Editierung des BCR (*receptor editing*) kommen, wodurch die Spezifität der Antigenbindestelle verändert wird (39, 40). Nachdem unreife B-Zellen diese zentralen Toleranzmechanismen durchlaufen haben, verlassen sie mit einem funktionsfähigen und monospezifischen BCR auf ihrer Zelloberfläche das Knochenmark und wandern in die Peripherie aus. Diese Zellen werden nun als transitionale B-Zellen bezeichnet. In **Abb. 1.2** sind die einzelnen Schritte der B-Zell-Entwicklung graphisch zusammengefasst.

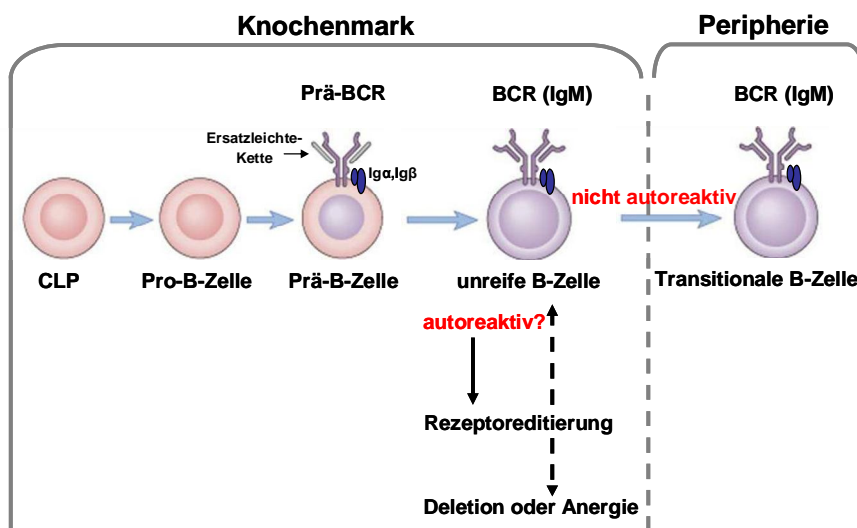


Abb. 1.2: Darstellung der B-Zell-Entwicklung, modifiziert nach Vilen *et al.* (41)

1.2.2 Reifung der B-Zellen in der Peripherie

Von den 2×10^7 IgM⁺ B-Zellen, die täglich im Knochenmark entstehen, gelangen nur ca. 10 % in die Milz und nur ein Drittel davon entwickelt sich zu reifen B-Zellen (42, 43). Unreife B-Zellen verweilen einige Tage im Knochenmark, bevor sie als transitionale (T) B-Zellen über den Blutstrom in sekundäre lymphatische Gewebe auswandern. Es werden zwei Subpopulationen von transitionalen B-Zellen unterschieden (44). T1 B-Zellen können im Knochenmark, der Milz und im peripheren Blut nachgewiesen werden, wobei ihre fehlende Expression von L-Selektin (CD62L) die Einwanderung in die Lymphknoten verhindert. Diese Zellen können durch ihre hohe Expression von IgM (IgM^{hoch}) bei gleichzeitiger Negativität für IgD (IgD⁻) identifiziert werden. Aus T1 B-Zellen entstehen nach Stimulierung des BCR die T2 B-Zellen. Diese Population ist durch die starke Expression von IgM und IgD (IgM^{hoch}, IgD^{hoch}) gekennzeichnet. T2 B-Zellen sind proliferationsaktiv und ausschließlich in der Milz lokalisiert. Räumlich sind die T1 B-Zellen innerhalb der Milz in der periarteriolen lymphoiden Schicht (PALS) angesiedelt, während sich die T2 B-Zellen in den Follikeln befinden (44, 45). T2 B-Zellen differenzieren zu follikulären reifen B-Zellen oder Marginalzonen (MZ) B-Zellen. Follikuläre B-Zellen können migrieren und sind in der Milz, den Lymphknoten, im peripheren Blut und im Knochenmark zu detektieren. Sie zirkulieren aktiv zwischen Blut und sekundären Lymphorganen, während die MZ B-Zellen ausschließlich in der Marginalzone der Milz verbleiben.

1.3 Allogene Stammzelltransplantation

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist eine therapeutische Option für Patienten mit malignen und einigen nicht-malignen hämatologischen Erkrankungen. Nach chemo- und/oder strahlentherapeutischer Vorbehandlung zur Myeloablation werden Stammzellen eines gesunden Spenders auf den erkrankten Empfänger übertragen, wodurch es im Verlauf zum Austausch des blutbildenden Systems kommt. Klassischerweise wurden HSC durch wiederholte Punktion des Beckenkamms aus dem Knochenmark, dem physiologischen Ort der Hämatopoese, gewonnen. Mittlerweile werden jedoch zunehmend periphere Blutstammzellen transplantiert (46). Da unter physiologischen Bedingungen nur ein sehr geringer Anteil an HSC im peripheren Blut zirkuliert, werden diese durch Verabreichung des hämatopoetischen Wachstumsfaktors G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) ins periphere Blut mobilisiert, so dass sie

nach 4-5 Tagen G-CSF-Behandlung mittels Stammzellapharese isoliert werden können (47, 48). Eine alternative Stammzellquelle stellt Nabelschnurblut dar, das aufgrund der geringen Menge an Stammzellen bisher hauptsächlich für die Transplantation von Säuglingen und Kleinkindern angewandt wurde (49-52). Heute wird Nabelschnurblut jedoch zunehmend auch bei Erwachsenen eingesetzt (53-55), wobei die benötigte Stammzellzahl durch die Transplantation von zwei Nabelschnurtransplantaten unterschiedlicher Spender erreicht wird. Es konnte gezeigt werden, dass sich dadurch kurzzeitig Vorläuferzellen beider Spender ansiedeln, sich dauerhaft jedoch ein Stammzelltransplantat durchsetzt und die Hämatopoese langfristig aufrecht erhält. Da bei der allogenen HSZT Zellen genetisch divergenter Individuen ausgetauscht werden (abgesehen von der seltenen Transplantation zwischen eineiigen Zwillingen), sind immunologische Komplikationen nach Transplantation *a priori* zu erwarten. Die Stärke der Immunreaktion wird bestimmt von der Expression divergierender Proteine, vor allem von den Haupthistokompatibilitätsantigenen (*major histocompatibility complex*, MHC), aber auch von den Nebenhistokompatibilitätsantigenen (*minor histocompatibility antigens*, MiHA). Beim Menschen wird der MHC als HLA (*human leukocyte antigen*) bezeichnet. Der MHC ist ein polymorpher Genkomplex, der für Membranproteine kodiert, die der Antigenpräsentation dienen und die Basis darstellen für die Diskriminierung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ durch T-Lymphozyten (s.o.). Die polymorphen Gene des HLA-Komplexes befinden sich beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (56, 57). Es gibt zwei Klassen von HLA-Molekülen. Klasse I Moleküle (HLA-A, HLA-B, HLA-C) sind auf der Oberfläche von nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert und dienen der Präsentation intrazellulärer Proteinfragmente an CD8⁺ T-Zellen. Klasse II Moleküle (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) werden von professionellen APC, wie Monozyten/Makrophagen, DC und B-Zellen exprimiert und präsentieren den CD4⁺ T-Zellen exogene Antigene (58). Damit es nach einer Transplantation nicht zu schweren Immunreaktionen kommt, müssen Spender und Empfänger histokompatibel sein, d.h. es sollte kein Unterschied im HLA-System vorhanden sein. Transplantationsrelevante Loci sind vor allem HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 und HLA-DBQ1. Je größer die Übereinstimmung in den HLA Merkmalen ist, umso geringer ist die Wahrscheinlichkeit von Transplantatreaktionen, da die Vorläuferfrequenz für HLA-reagible allogene T-Zellen sehr hoch ist (bis zu 10 % bei HLA-differenter Transplantation). Jedoch kommt es immer wieder vor, dass trotz HLA-Identität Transplantatreaktionen in Form von Abstoßungsreaktionen (selten) oder Spender-gegen-Wirts-Reaktionen (graft-versus-host disease [GVHD]; häufig) nach allogener Transplantation auftreten. Diese werden durch die oben erwähnten MiHA ausgelöst (59). Im Rahmen der GVHD werden empfängerspezifische Peptide von polymorphen Proteinen (die im Spenderorganismus nicht vorkommen und gegen die Spender-T-Zellen deshalb nicht tolerant sind) über Spender- oder Empfänger-APC präsentiert. Die immunokompetenten T-

Zellen im Transplantat können gegen diese fremden Antigene reagieren und dadurch schwere Immunreaktionen gegen Gewebe des Empfängers auslösen, die sich klinisch als GVHD manifestieren. Über ähnliche Mechanismen ist umgekehrt bisweilen auch die Abstoßung der transplantierten Stammzellen durch residuale Empfänger T-Zellen zu beobachten (*Host-versus-Graft-Reaktion*, HVG) (60). In dem Versuch, die lebensbedrohliche GVHD zu verhindern, wurden vielfach T-Zellen aus dem Transplantat eliminiert. Es zeigte sich jedoch rasch, dass hierdurch meist keine Verbesserung der Therapieergebnisse zu erzielen war, da das GVHD-Risiko zwar vermindert wurde, die Patienten aber vermehrt an Rückfällen ihrer malignen Grunderkrankung oder an opportunistischen Infektionen verstarben (61, 62). Hierdurch wurde indirekt auch bewiesen, dass Spender-T-Zellen wesentlich zum Erfolg dieses Therapieverfahrens beitragen, da sie MiHA auf hämatopoetischen Zellen erkennen und dadurch Empfängerhämatopoese effizient immunologisch eradizieren. Dieser Spender-gegen-Hämatopoese-Effekt geht mit einer sehr effektiven Spender-gegen-Leukämie-Wirkung (*Graft-versus-Leukemia*, GVL) einher, die mittlerweile als zentrales Wirkprinzip der allogenen HSZT erachtet wird und ihre höhere Wirksamkeit im Vergleich zur autologen Transplantation (bei ähnlich starker Konditionierung) erklärt. Diese Erkenntnisse führten mittlerweile dazu, dass die Vorbehandlung der Patienten (Konditionierung) häufig nicht mehr myeloablativ durchgeführt wird, sondern lediglich ausreichend immunsuppressiv sein muss um eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern (63). Die Eradikation der Patientenhämatopoese (und residueller Leukämie-/Lymphomzellen) erfolgt anschließend allein durch die ko-transplantierten T-Lymphozyten. Insofern ist die allogene HSZT heutzutage nicht mehr als rein chemo-/radiotherapeutisches Therapieverfahren aufzufassen, sondern primär als adoptive Zelltherapie (64). Neben der anti-hämatopoetischen und anti-leukämischen Wirkung tragen transplantierte T-Zellen auch zum besseren Engraftment der Stammzellen bei und schützen vor opportunistischen Infektionen in der Posttransplantationsphase.

1.3.1 Graft-versus-Host-Disease (GVHD)

Die GVHD ist eine immunologische Reaktion der Spender T-Lymphozyten gegen das Empfängergewebe und kommt als akute (aGVHD) oder chronische (cGVHD) Form vor. Während die aGVHD innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation auftritt, zeigt sich die cGVHD frühestens ab Tag 100 (65-67). Neben dem Krankheitsrückfall ist die GVHD die Hauptursache für die hohe Morbidität und Mortalität von Patienten nach allogener HSZT. Vor ca. 50 Jahren postulierte Billingham drei Voraussetzungen für die Entstehung der GVHD. Zum ersten muss das Transplantat immunkompetente Zellen enthalten, zum zweiten muss das Gewebe des Empfängers Alloantigene aufweisen, welche vom Spender nicht

exprimiert werden, so dass diese Histoinkompatibilität zur Stimulation der im Transplantat enthaltenen Donorzellen führt. Drittens muss der Empfänger derart immunsupprimiert sein, dass er nicht in der Lage ist, die transplantierten Zellen durch eine effektive Immunantwort zu eliminieren (68). Diese Hypothesen wurden mittlerweile allesamt experimentell bestätigt (z.B. durch Beschreibung des HLA-Systems) und sind bis heute gültig. Im Rahmen der aGVHD kommt es zur Zerstörung typischer Zielorgane, vor allem von Haut, Darm und Leber, aber auch von lymphatischen Organen (69, 70). Die Häufigkeit und Schwere einer GVHD nach allogener HSZT ist vor allem vom Grad der Histokompatibilität abhängig, daneben aber auch von einer Reihe anderer Faktoren, z.B. vom Alter des Patienten (deutlich geringere Inzidenz bei Kleinkindern) und der Menge transferierter T-Zellen.

1.3.1.1 Akute GVHD

Wie in **Abb. 1.3** dargestellt, wird die Pathophysiologie der aGVHD in 3 Phasen eingeteilt (71-74). Die Konditionierung des Patienten führt in der ersten Phase zu Gewebeschädigungen, was zur Freisetzung großer Mengen pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 und TNF („Zytokinsturm“) führt (75, 76). Hierdurch werden antigenpräsentierende Zellen (APC) aktiviert, so dass sie verstärkt Adhäsionsmoleküle, kostimulatorische Moleküle und MHC-Moleküle exprimieren („danger“ Signale) (77). Darüber hinaus führt die konditionierungsbedingte Toxizität am Darm zu Mucosaschädigungen und damit verbunden zur Durchwanderung von Bakterien aus dem Darmlumen und zur Freisetzung z.B. von Lipopolysacchariden (LPS). Dies führt ebenfalls zur Ausschüttung von TNF, IL-1 und dem stark gewebetoxischen Stickstoffmonoxid (NO) durch die im Gastrointestinaltrakt residierenden Makrophagen (75) und in der Folge zur APC Aktivierung. In der Transplantationsphase werden Spender-T-Zellen aus dem Transplantat in dieses pro-inflammatorische Milieu eingebracht. Die Zellen migrieren in die sekundären Lymphorgane und werden dort durch die Empfänger-APCs aktiviert. Bei MHC-differenter Transplantation können Spender-T-Zellen direkt auf die körperfremden MHC-Moleküle auf den APC des Empfängers reagieren (direkte Alloreaktion) (78, 79). Bei der sogenannten indirekten Alloantigenerkennung werden Peptide von differierenden Empfänger-MHC-Molekülen im MHC von Empfänger- oder Spender-APC präsentiert (80, 81). Die dritte Möglichkeit der Allostimulation erfolgt über MiHA, d.h. der Präsentation von Peptiden polymorpher Proteine, wodurch selbst nach MHC-identer HSZT GVH-Reaktionen ausgelöst werden können (78, 82). Die Spender T-Zellen beginnen in der Folge zu proliferieren und produzieren ihrerseits proinflammatorische Zytokine wie IL-2 und IFN γ . Dies führt in der Folge zur Differenzierung und Aktivierung von CTL sowie von Makrophagen und NK-Zellen. Letztendlich kommt es in der dritten Phase, der sogenannten Effektorphase, über eine komplexe Kaskade

verschiedener Effektormechanismen zur Zerstörung der GVHD-Zielorgane. Diese werden sowohl durch zelluläre Effektoren wie CTL und NK-Zellen, aber auch durch inflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1 oder das NO vermittelt (75). Durch inflammatorische Zytokine werden in den entzündeten Geweben Chemokine induziert, die zur Migration der Effektorzellen in die GVHD Zielorgane beitragen (83). CTL vermitteln ihre Zytotoxizität durch direkten Zellkontakt über Perforin/Granzym oder nach Induktion des Fas Liganden (FasL) durch Interaktion mit Fas auf der Zielzelle, wodurch diese in Apoptose geht (60, 84).

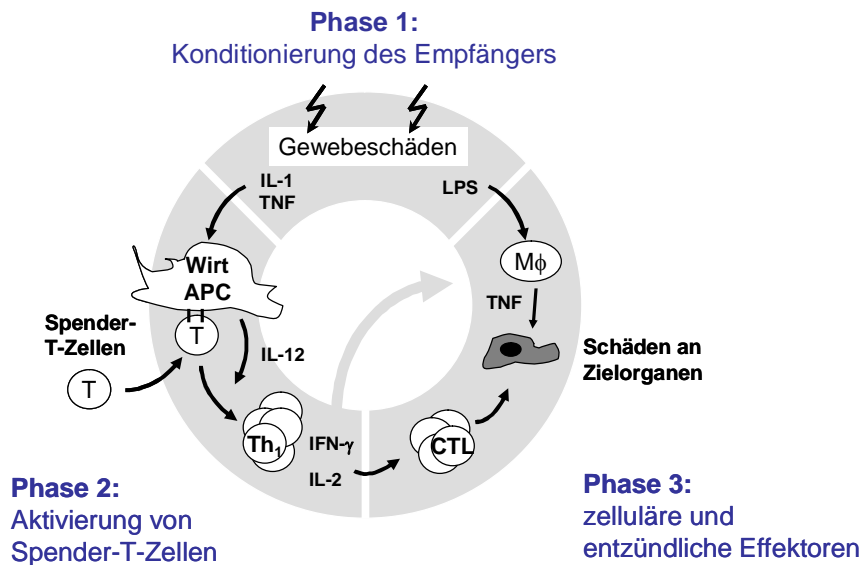


Abb. 1.3: Pathophysiologie der GVHD. Modifiziert nach Hill *et al.* (75)

1.3.1.2 Strategien zur Prophylaxe und Therapie der GVHD

Aufgrund der hohen T-Vorläuferfrequenz für die direkte Erkennung allogener HLA-Moleküle ist die HLA-Typisierung von Empfänger und potentielltem Spender die wichtigste Maßnahme zur Vermeidung der GVHD. Zur Verhinderung einer Abstoßung, vor allem aber zur Verhinderung der durch MiHA ausgelösten GVHD, enthält jedes Konditionierungsregime eine immunsuppressive Komponente. Die unterschiedlichen Ziele der Patientenvorbehandlung (Tumoreradikation, Myeloablation und Immunsuppression) sind der Grund für die Bezeichnung „Konditionierung“, da es sich nicht lediglich um eine strahlen- oder chemotherapeutische Therapie handelt, sondern sämtliche Faktoren für ein erfolgreiches Anwachsen der Spenderhämatopoese berücksichtigt werden müssen. In Abhängigkeit von der klinischen Situation (z.B. residuelle Erkrankung bei Transplantation) wird die Gewichtung der einzelnen Therapiekomponenten individuell angepasst. Die klassische und in allen Zentren etablierte Immunsuppression bei T-Zell-haltigem Transplantat besteht aus der Verabreichung des Calcineurininhibitors Cyclosporin A (CSA) in Kombination mit niedrig

dosiertem Methotrexat (MTX) an den Tagen 1, 3, 7 und 11 nach Transplantation. CSA führt zur Verminderung der IL-2 Synthese und hemmt somit die Aktivierung und die Proliferation von T-Lymphozyten (85). CSA wird heute z.T. durch neuere Calcineurininhibitoren (z.B. Tacrolimus) ersetzt. Methotrexat, ein Zytostatikum mit immunsuppressiver Wirkung, ist ein Antimetabolit und inhibiert das Enzym Dihydrofolatreduktase, welches maßgeblich an der DNA Synthese beteiligt ist. Hierdurch kommt es zu einer Beeinträchtigung der Nukleinsäuresynthese und damit zu einer Störung des Zellstoffwechsels (86). Der Einsatz der Immunsuppressiva hat jedoch auch eine erhöhte Infektionsrate zur Folge und führt z.T. zu erheblichen Organtoxizitäten.

Eine neuere Strategie zur Reduktion des GVHD-Risikos ist die Verhinderung von Gewebeschädigungen (vor allem des Gastrointestinaltraktes) durch Reduktion der Konditionierungsintensität (87). Hierfür wurden dosisreduzierte Konditionierungsprotokolle (*reduced intensity conditioning*, RIC) bis hin zu nicht-myeloablativen Protokollen entwickelt. Im Vergleich zur konventionellen (myeloablativen) Hochdosismethotherapie (z.T. kombiniert mit Ganzkörperbestrahlung) konnten die Gewebeschäden und die Bildung von inflammatorischen Zytokinen reduziert und dadurch eine Reduktion der frühen akuten GVHD erreicht werden (76, 88). Insgesamt wurde die GVHD-Rate jedoch nur marginal verändert, da sie lediglich verspätet auftrat und außerdem erhöhte die nicht-myeloablativ Konditionierung das Risiko für Transplantatabstoßungen und Krankheitsrückfälle (89). Aufgrund der deutlich reduzierten Gesamttoxizität werden diese Protokolle aber zunehmend zur Transplantation älterer Patienten eingesetzt, die bis dahin von Transplantationsverfahren generell ausgeschlossen wurden.

Eine weitere Strategie zur GVHD-Prohylaxe ist die T-Zell-Depletion. Hiefür werden vor allem bei der HLA-identischen Fremdspendertransplantation Tierseren eingesetzt (meist aus dem Kaninchen), die nach Immunisierung mit Thymozyten (Thymoglobulin®) oder der T-Zelllinie Jurkat (ATG-Fresenius®) zytotoxische Antikörper gegen humane Lymphozyten enthalten. Die Verabreichung dieser Seren zum Zeitpunkt der Transplantation führt zur Depletion von Spender- und Empfänger-T-Zellen. Vor allem in britischen Transplantationszentren wird ATG zusehends durch den monoklonalen Antikörper Alemtuzumab ersetzt, der an das Glykoprotein CD52 auf der Zelloberfläche von Lymphozyten bindet und diese lysiert (90). Neben der Depletion von T-Zellen *in vivo* kann dieser Antikörper auch dem Stammzelltransplantat zugefügt werden, so dass eine *ex vivo* Depletion von T-Lymphozyten erfolgt (sog. „*Campath in the bag*“). Bei Hochrisikokonstellationen bzgl. der GVHD wie z.B. bei haploidenter Transplantation (Transplantation zwischen Verwandten 1. Grades mit nur 50 %-iger HLA-Identität), werden häufig noch aggressivere T-Zell-Depletionsstrategien angewandt. Hierzu zählt insbesondere die Positivselektion von hämatopoetischen Stammzellen *in vitro* mittels anti-CD34-Magnetbeadselektion, die zur hochgradigen

Aufreinigung der Stammzellen mit einer marginalen T-Zell-Kontamination führt. All diesen Strategien ist gemeinsam, dass sie das GVHD-Risiko reduzieren, die Gefahr von opportunistischen Infektionen oder Krankheitsrückfällen aber erhöhen und die Immunrekonstitution verzögern (91-93).

Tritt eine akute GVHD trotz prophylaktischer Immunsuppression auf, besteht die etablierte Erstlinientherapie in der Verabreichung hochdosierter Steroide. Kortikosteroide besitzen anti-inflammatorische Aktivität. Durch die Hemmung der IL-2 Produktion wird die Proliferation von T-Lymphozyten gehemmt und Apoptose induziert (94). Bei Steroidrefraktärität einer schweren akuten GVHD ist die Prognose prinzipiell infaust, d.h. es gibt keine anerkannte Zweitlinientherapie und es werden diverse Immunsuppressions- und -modulationsstrategien eingesetzt. Hierzu gehören z.B. die Kombinationstherapie aus Steroiden mit mTOR-Inhibitoren (z.B. Sirolimus), T-Zell-Depletionsverfahren (z.B. ATG oder Alemtuzumab; s.o.) sowie der Einsatz sogenannter „Biologika“, die sich an der Pathophysiologie orientieren und z.B. Zytokine blockieren (anti-TNF [Infliximab]) (95). Ähnliche Strategien, die derzeit in klinischen und präklinischen Studien getestet werden, sind die Blockade von kostimulatorischen Molekülen, z.B. durch Einsatz des Fusionsproteins CTLA-4-Ig oder von Antikörpern gegen CD80, CD86 oder gegen CD154 (CD40L), die die Interaktion von T-Zellen mit APC inhibieren (96, 97). Zelluläre Immunmodulationsstrategien in klinischer Testung sind die Transfusion sogenannter *in vitro* expandierter mesenchymaler Stammzellen, die entweder vom Knochenmarkspender selbst oder einem Drittsponder generiert werden (98). Der Funktionsmechanismus dieser Therapie ist genauso unbekannt und viel diskutiert wie die sehr erfolgreich eingesetzte extrakorporale Photopherese. Hierbei werden mittels Aphaese Leukozyten des Patienten aus dem peripheren Blut isoliert. Es erfolgt zuerst eine Inkubation der Zellen mit dem DNA-interkalierenden Wirkstoff 8-Methoxypsoralen (8-MOP), der die Zellen für die anschließende UV Bestrahlung sensibilisiert und deren Apoptose induziert. Es wird vermutet, dass nach Reinfusion der Zellen regulatorische T-Zellen (Treg) induziert werden, die zum therapeutischen Effekt beitragen (99). Im Unterschied zu diesen induzierten Treg-Zellen beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe seit Jahren mit der Rolle thymusstämmiger (natürlicher) Treg-Zellen in der Transplantationsmedizin (100-102).

1.3.2 Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation

Der Verlauf der Immunrekonstitution nach Transplantation ist von verschiedenen Faktoren abhängig, u.a. vom Alter des Patienten, der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger, dem Auftreten einer GVHD, den eingesetzten Immunsuppressiva zur GVHD Prophylaxe sowie von der Beschaffenheit des Transplantats (Gesamt- oder T-Zell-depletiertes Stammzellprodukt) (103). Während es innerhalb weniger Wochen nach der

allogenen HSZT zu einer schnellen Rekonstitution der Myelopoese und der NK-Zellen kommt, zeigen Patienten eine über einen langen Zeitraum (bis zu 2 Jahre) andauernde B- und T-Zell-Defizienz (adaptives Immunsystem). Diese Immundefizienz ist mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von opportunistischen Infektionen sowie eines Krankheitsrückfalls verbunden (104). Die T-Zell-Rekonstitution nach HSZT kann auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen, nämlich thymusabhängig und thymusunabhängig (105). Bei der thymusunabhängigen Rekonstitution handelt es sich um eine antigengetriggerte homöostatische Expansion (HE) reifer Spender T-Zellen aus dem Transplantat, die in den lymphopenen Patienten stark proliferieren (106, 107). Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire dieser Zellen ist infolgedessen auf die TCR Spezifitäten im Transplantat beschränkt (108). Aufgrund ihrer starken Stimulation und Expansion verliert ein Großteil der Zellen die Oberflächenexpression von Homingrezeptoren für die Migration in sekundäre Lymphorgane (z.B. CD62L und CCR7), so dass sie dort nicht mit APC interagieren und B-Zellen stimulieren können. Trotzdem trägt die HE zur frühen Immunität nach HSZT bei und wird später durch die thymusabhängige T-Zell-Rekonstitution ergänzt. Bei dieser thymusabhängigen Rekonstitution entwickeln sich „neue“ T-Zellen (wie in der Ontogenese) durch Differenzierung von Vorläuferzellen aus den transplantierten Stammzellen, die anschließend vom Knochenmark in den Thymus auswandern (109). Durch das Rearrangement der T-Zell-Rezeptor-Gene und die anschließende positive und negative Selektion im Thymus entsteht die Diversität des T-Zell-Repertoires und es kommt zur Entwicklung eines voll ausgereiften T-Zell-Kompartiments. Während der Umlagerung von Genen für den TCR im Thymus entstehen sogenannte TREC (TCR *rearrangement excision circles*), die ein geeigneter Marker für „recent thymic emigrants“ (RTE) sind, so dass die Anzahl der TRECs im peripheren Blut für die Quantifizierung der T-Zell-Neubildung im Thymus herangezogen werden kann (110). Auch die Analyse von T-Zell-Rezeptor-Repertoire (109) und die phänotypische Charakterisierung von T-Zellen bezüglich der Expression von z.B. CD45RA und CD62L, die vor allem auf kürzlich aus dem Thymus emigrierten naiven CD4⁺ T-Zellen zu finden sind, können Aufschluss über die Thymopoese geben (111). Anhand solcher Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass ein Wiedereinsetzen der Thymusfunktion üblicherweise erst mehrere Monate nach der Transplantation stattfindet. Da der Thymus auch ein GVHD-Zielorgan darstellt und von alloreaktiven T-Zellen schwer geschädigt werden kann, ist die Thymopoese bei Patienten mit GVHD häufig erheblich verzögert (112).

Neben der T-Zelldefizienz zeigen Patienten nach allogener HSZT auch eine lang andauernde B-Zelldefizienz. Die Risikofaktoren für das Ausmaß und die Dauer der B-Zelldefizienz unterscheiden sich nicht wesentlich von denen für die T-Zelldefizienz und schließen die Art des Transplantats und die Stammzelldosis ein sowie das Alter der

Patienten und die Verabreichung und Art der Immunsuppressiva. Wichtigster Risikofaktor ist jedoch das Auftreten und die Schwere einer GVHD und/oder ihre Behandlung (113, 114). In älteren klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass es im Rahmen der GVHD nicht nur zu einer deutlich verminderten Anzahl an reifen B-Zellen in der Peripherie kommt, sondern auch zu einer deutlichen Defizienz in den einzelnen Vorläuferstadien der B-Zelle im KM (115-117). Selbstverständlich konnte in diesen klinischen Untersuchungen nicht differenziert werden, ob die B-Zell-Defizienz durch die GVHD verursacht wurde oder eine Folge der prophylaktischen und/oder therapeutischen Immunsuppression darstellt. Die Klärung des Einflusses der GVHD auf die B-Zell-Rekonstitution ist zentrales Thema dieser Arbeit. In einem murinen Transplantationsmodell ohne Einsatz pharmakologischer Immunsuppressiva soll untersucht werden, welchen Einfluss die GVHD auf die B-Zell-Rekonstitution hat. Zudem soll analysiert werden, ob die B-Zell-Defizienz zentral oder peripher verursacht wird, ob zelluläre Mechanismen oder Zytokine für die B-Zell-Defizienz verantwortlich sind (z.B. $\text{IFN-}\gamma$ von aktivierten T-Zellen oder IL-1 von Makrophagen im Rahmen des sog. Zytokinsturmes nach HSZT) (114, 118) und ob B-Vorläuferzellen im KM direktes Target der GVHD sind oder indirekt über Schädigung des KM-Stroma betroffen werden (*Graft-versus-Stroma-Reaction*) (119). Da Stromazellen für viele wichtige Schritte in der frühen B-Zellentwicklung entscheidende Stimuli liefern (s. 1.2.1.1), könnte ihre Schädigung ein Grund für die beobachtete Defizienz sein (120).

1.4 Regulatorische T-Zellen

Positiv- und Negativselektion im Thymus sind die Hauptmechanismen zum Schutz von T-Zell-induzierten Autoimmunerkrankungen. Selbst in Gesunden sind jedoch potentiell autoreaktive T-Zellen nachweisbar, so dass die Negativselektion offensichtlich lückenhaft ist. Dass es trotzdem nur in seltenen Fällen zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen kommt, liegt an verschiedenen peripheren Toleranzmechanismen. Dazu zählen passive Mechanismen wie Deletion, Anergie und Ignoranz (121, 122), aber auch die aktive Suppression selbstreaktiver T-Zellen durch sogenannte regulatorische T-Zellen. Es wurden unterschiedliche T-Zell-Subpopulationen mit regulatorischen Eigenschaften beschrieben; dazu gehören $\gamma\delta$ T-Zellen, NKT-Zellen, $\text{CD8}^+\text{CD28}^-$ und $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T-Zellen (123). Letztere umfassen sowohl die heterogene (und nur mäßig charakterisierte) Subpopulation der in der Peripherie induzierten $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-Zellen (iTreg), als auch die homogene, bereits im Thymus ausdifferenzierte Subpopulation der natürlichen Treg-Zellen (nTreg).

1.4.1 Natürliche regulatorische T-Zellen

Mitte der 90er Jahre wurde von Shimon Sakaguchi und seinen Mitarbeitern eine Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen der Maus beschrieben, die konstitutiv die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) exprimiert. Diese Zellen umfassen ca. 5-10 % aller peripheren CD4⁺ T-Zellen in naiven Mäusen und werden mittlerweile natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) genannt (124, 125). Ihr suppressives Potential konnte in einem adoptiven T-Zell-Transfermodell gezeigt werden. In diesem Modell wurden durch Transfer von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in immundefiziente Nacktmäuse Autoimmunerkrankungen induziert, die durch den ko-Transfer von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen verhindert werden konnten (124). In Thymektomie-experimenten konnte er zeigen, dass die immunsuppressive T-Zellpopulation im Thymus generiert und erst ca. 3 Tage nach Geburt von dort in die Peripherie exportiert wird. Neugeborene Wildtypiere entwickelten nach Thymektomie nämlich ähnliche Autoimmunphänomene wie die Nacktmäuse, die durch den Transfer von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen adulter Tiere ebenfalls verhindert wurden (126). In Abgrenzung zu den in Verruf gekommenen Suppressorzellen wurden sie „regulatorische T-Zellen“ genannt und aufgrund ihrer Entstehung im Thymus erhielten sie die Zusatzbezeichnung „natürliche“ Treg-Zellen. Eine vergleichbare Population mit identischen phänotypischen und funktionellen Eigenschaften wurde mittlerweile in der Ratte, in Primaten und im humanen System beschrieben. Die am häufigsten genutzten Marker zur Identifizierung von regulatorischen T-Zellen sind neben der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) (124) das konstitutiv intrazellulär exprimierte CLTA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*) (127, 128), GITR (*Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor family related gene*) (129), Lag-3 (*lymphocyte activation gene 3*) (130) und die verminderte Expression der α -Kette des IL-7 Rezeptors (CD127) (131, 132). Diese Oberflächenmarker sind allerdings nicht sehr spezifisch, da sie alle auch von konventionellen T-Zellen nach Aktivierung exprimiert werden. Auch die verminderte Expression von CD127 unterscheidet Treg-Zellen nicht zuverlässig von aktivierten konventionellen T-Zellen, da es auf diesen nach Aktivierung ebenfalls herunterreguliert wird (133-136). Die derzeit zuverlässigste Methode zur Identifizierung von Treg-Zellen ist die Expression des im Jahre 2001 charakterisierten Transkriptionsfaktors FoxP3 (*forkhead winged helix protein*). FoxP3 wurde als molekularer Marker und Schlüsselgen (*master regulator*) für die Differenzierung und Funktion von regulatorischen T-Zellen identifiziert. Das Molekül FoxP3 wurde erstmals durch molekulargenetische Analysen in der Scurfy Maus entdeckt. Der in dieser Maus beobachtete Autoimmunphänotyp wird durch eine Frameshift-Mutation im foxp3 Gen verursacht, die zu einem sofortigen Abbau des FoxP3 Moleküls führt (137). Es handelt sich hierbei um eine X-chromosomale rezessive Mutation, die in hemizygoten Männchen zu schweren lymphoproliferativen Autoimmunerkrankungen führt. Diese Mäuse sterben innerhalb von 4 Wochen nach ihrer Geburt.

Vergleichbare Mutationen im *foxp3* Gen wurden auch bei Patienten gefunden, die unter dem IPEX-Syndrom (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) leiden (138). Die schweren Autoimmunerkrankungen dieser Patienten führen ohne Behandlung (allogene Stammzelltransplantation) oft schon im Kleinkindalter zum Tod (139, 140). FoxP3 wird in CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression dieses Transkriptionsfaktors in Tconv Zellen immunsuppressorische Eigenschaften induziert (141). Die molekulare Wirkweise von FoxP3 beruht hauptsächlich auf seiner Funktion als transkriptioneller Repressor. Foxp3 bindet DNA-Sequenzen in den Promotorregionen von Zytokingenen wie IL-2, IL-4, IFN γ und TNF und unterdrückt somit die NFAT und NF- κ B induzierte Zytokintranskription (142). Zusätzlich kann Foxp3 aber auch als Aktivator fungieren und Treg-spezifische Gene induzieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor FoxP3 ein Treg-spezifisches Expressionsprofil stabilisiert, das zunächst unabhängig von FoxP3 entsteht, und dass für die Aufrechterhaltung der suppressorischen Funktion von Tregs eine permanente und stabile Expression von FoxP3 notwendig ist (143). Ein Vergleich der Proteinexpression in CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen und naiven, bzw. aktivierten Tconv Zellen zeigte, dass Foxp3 konstitutiv in CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen exprimiert wird. Dadurch ist es möglich, nTreg-Zellen (FoxP3⁺) von aktivierten T-Zellen (FoxP3⁻) zu unterscheiden (141, 144). Da es sich bei FoxP3 jedoch um ein intranukleär exprimiertes Protein handelt, konnten bisher über diesen Marker keine vitalen nTreg-Zellen isoliert werden. Durch die Entwicklung von FoxP3-Reportermäusen gelingt dies mittlerweile zumindest in tierexperimentellen Studien, so dass die Ontogenese von FoxP3⁺ T-Zellen untersucht werden kann (126). Intrathymische Transferexperimente deuten darauf hin, dass nTreg-Zellen aus CD4⁻CD8⁻ doppelt negativen Thymozytenvorläufern entstehen. (133). Sie werden durch die Interaktion mit kortikalen Thymusepithelzellen positiv selektioniert. Es wird postuliert, dass sie einen vergleichsweise hochaffinen TCR für die über MHC-Klasse-II präsentierten Selbstantigene auf Thymusepithelzellen besitzen, jedoch nicht ausreichend stark reagieren, um anschließend negativ selektioniert zu werden (145).

Funktionell zeigen nTreg-Zellen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* suppressive Eigenschaften (124, 146). Sie selbst sind *in vitro* anerg, d.h. sie proliferieren nicht nach alleiniger TCR-Stimulation, was auf ihre fehlende IL-2 Transkription und Sekretion zurückzuführen ist (147). Durch die Zugabe von exogenem IL-2 kann dieser anerge Zustand aufgehoben werden. Erst nach ihrer eigenen TCR-Aktivierung gewinnen sie suppressive Eigenschaften und können die Proliferation und Zytokinproduktion sowohl von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen supprimieren (148). Während die Aktivierung über ihren TCR antigenspezifisch erfolgt, ist die Suppressionsphase antigenunabhängig. Obwohl anfangs vermutet wurde, dass nTreg aufgrund ihrer thymalen Selektion nur selbstreaktive Immunzellen unterdrücken, zeigen

neuere Studien mittlerweile, dass sie auch Immunantworten auf nicht-selbst Antigene wie z.B. mikrobielle Antigene (149), Alloantigene (150) und Tumorantigene (151) regulieren.

1.4.1.1 Mechanismus der Suppression durch nTreg

Die molekularen Mechanismen der Treg-Suppression sind bisher noch nicht eindeutig aufgeklärt, z.Z. werden aber zahlreiche Regulationsmechanismen diskutiert. Anfänglich wurde vermutet, dass die Suppression von Tconv Zellen ausschließlich über einen direkt zellkontaktabhängigen Prozess erfolgt, da die *in vitro* Suppression durch die Verwendung einer semipermeablen Membran zur Separation der T-Zell-Populationen in Kokulturen aufgehoben werden konnte (152, 153). Später zeigten intravitalmikroskopische Aufnahmen, dass nTreg *in vivo* präferentiell mit Dendritischen Zellen interagieren und nicht nur mit potentiellen Effektorzellen. (154). Insofern scheinen nTreg-Zellen ihre Funktion auch über die Modulation der Reifung oder Funktion von DC zu vermitteln und dadurch die Aktivierung und Expansion konventioneller T-Zellen zu inhibieren. Ein Effektormolekül in dieser Interaktion könnte das konstitutiv exprimierte CTLA-4 sein. Die Blockade von CTLA-4 in naiven Mäusen führt zu organspezifischen Autoimmunerkrankungen, vergleichbar mit denen nach Depletion von nTreg-Zellen (133). Die Interaktion von CTLA-4 der nTreg-Zellen und dem CD80/CD86 auf DCs reduziert deren Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren. Des Weiteren führt diese Interaktion zur Induktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in DC (155). IDO katalysiert die Umwandlung von Tryptophan in Kynurein und andere Metabolite, die einen direkten immunsuppressiven Effekt auf die Tconv bewirken. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Suppression von Tconv durch nTreg-Zellen auch in Abwesenheit von DCs möglich ist, was die Rolle von CTLA-4 für die Suppression in Frage stellt (156).

Ein weiteres Oberflächenantigen, das bei der durch nTreg-Zellen vermittelten Suppression der DCs eine Rolle spielt, ist LAG-3. LAG-3 wird von nTreg-Zellen exprimiert. Es handelt sich hierbei um ein CD4-Homolog, das mit hoher Affinität an MHC II Moleküle bindet. Durch die Bindung von LAG-3 an MHC II Moleküle unreifer DC kommt es zur Induktion eines durch ITAM (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*) vermittelten inhibitorischen Signals, das die DC-Reifung und ihre Fähigkeit zur Immunstimulation supprimiert (157).

Kürzlich wurde als weiterer Suppressionsmechanismus eine Erhöhung des cAMP Spiegels in der Zielzelle durch nTreg-Zellen vorgeschlagen. Hierfür wird einerseits der direkte Transport von cAMP aus Treg-Zellen über sog. „Gap-Junctions“ in aktivierte Zielzellen beschrieben (158). Darüber hinaus sollen Treg-Zellen mittels ihrer Ektoenzyme CD39 und CD73 aus dem im Rahmen einer Inflammation extrazellulär anfallenden ATP und ADP perizelluläres Adenosin synthetisieren. Adenosin bindet an den A2A Rezeptor

konventioneller T-Zellen, wird internalisiert und inhibiert durch Aktivierung von ICER (inducible cAMP early repressor) die Produktion von IL-2 und IFN- γ (159, 160).

Neben diesen Zellkontakt-abhängigen Suppressionsmechanismen wird auch immer wieder die lokale Sekretion von inhibitorischen Zytokinen wie TGF β und IL-10 propagiert. Allerdings zeigten *in vitro* Studien unter Verwendung von neutralisierenden Antikörpern gegen TGF- β und/oder IL-10, dass diese Zytokine nicht essenziell sind für die Funktion von nTreg-Zellen (152, 153, 161, 162). Darüber hinaus zeigen nTreg-Zellen aus IL-10- oder TGF β -defizienten Mäusen eine mit Wildtyp-Tregs vergleichbare suppressive Aktivität *in vitro* (153, 163, 164). *In vivo* scheinen diese Zytokine jedoch in mehreren Krankheitsmodellen entscheidend zur Treg-Wirkung beizutragen (165, 166). Mit IL-35 wurde kürzlich ein weiteres Zytokin beschrieben, das präferenziell von nTreg-Zellen exprimiert wird und zur suppressiven Aktivität beiträgt (167). Anders als IL-10 und TGF β scheint IL-35 für die suppressive Funktion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* benötigt zu werden. Darüber hinaus wird seit längerem diskutiert, ob die hohe Expression von CD25 auf nTreg-Zellen zur kompetitiven Bindung von IL-2 führt. Da IL-2 für die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen benötigt wird, könnte die lokale Depletion von IL-2 zur Suppression von konventionellen T-Zellen führen (153, 168). Allerdings wurde nachgewiesen, dass nTreg Zellen aus IL-2 Rezeptor-defizienten Mäusen *in vitro* die gleiche suppressive Aktivität aufweisen wie regulatorische T-Zellen aus Wildtyptieren, so dass diese Hypothese immer wieder in Frage gestellt wird (169, 170). Aufgrund von Genexpressionsanalysen, in denen eine Überexpression von Granzyme B in nTreg detektiert wurde, wird zudem spekuliert, dass Treg-Zellen zytolytisch aktiv sind (129, 171). Obwohl in eigenen Studien eine solche Aktivität nicht beobachtet wurde, zeigten nTreg-Zellen aus Granzyme B-defizienten Mäusen in publizierten Daten eine verminderte suppressive Wirkung *in vitro* (172).

1.4.2 Induzierte regulatorische T-Zellen

Induzierte Treg-Zellen unterscheiden sich von nTreg in ihrer Entwicklung, der Expression von FoxP3 und dem Mechanismus ihrer suppressiven Aktivität. Die suppressive Wirkung der iTregs ist Zellkontakt-unabhängig und wird hauptsächlich über Zytokine vermittelt. Bisher wurden zwei Hauptpopulationen an iTreg-Zellen beschrieben, die sogenannten Tr1 und Th3 Zellen. Tr1 Zellen können *in vitro* sowohl durch die Zugabe hoher Mengen an IL-10 als auch durch Vitamin D3 (173, 174), oder dem Kortikosteroid Dexamethason (175) induziert werden. Nach ihrer Aktivierung über ihren TCR sind sie hypoproliferativ und sezernieren hohe Mengen IL-10 und TGF β , jedoch wenig IL-2 und kein IL-4. Es wurde beschrieben, dass diese Zellen durch ihre immunsuppressive Wirkung die Entwicklung einer T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankung verhindern (176). Tr1-Zellen inhibieren zellkontaktunabhängig die

Aktivierung von naiven und Gedächtnis-T-Zellen sowohl vom Th1- als auch Th2-Typ (176, 177). Ihre Entwicklung verläuft unabhängig von FoxP3 (178).

Sogenannte Th3 Zellen zeichnen sich durch eine hohe Expression von TGF- β aus und sezernieren im Unterschied zu Tr1-Zellen wenig IL-10 und IL-4. Auch deren Entwicklung erfolgt FoxP3-unabhängig. *In vivo* scheinen sie zur Aufrechterhaltung der mukosalen Toleranz beizutragen und werden nach oraler Antigenexposition vor allem in den mesenterialen Lymphknoten gebildet (179). In Modellen der multiplen Sklerose wurde gezeigt, dass diese mukosalen Toleranzmechanismen auch zur systemischen Toleranzinduktion ausgenutzt werden können, da die orale Applikation des MBP-Antigens (Myelin basisches Protein) spezifische Th3-Zellen induzierte und die Enzephalitis TGF β -abhängig unterdrückt wurde (180). Auch *in vitro* können diese aus CD4⁺ T-Zellen entstehenden Th3 Zellen durch IL-4 und TGF- β induziert werden.

1.4.3 Bedeutung der nTreg in der experimentellen GVHD

Natürliche Treg-Zellen supprimieren nicht nur autoreaktive T-Zellen, sondern inhibieren in Kokulturen auch die proliferative Antwort von Responderzellen in einer gemischten Lymphozytenkultur (*mixed lymphocyte reaction*, MLR), bei der die T-Zellen gegen MHC-differente Stimulatorzellen reagieren. Die starke Suppression dieser Alloreaktion führte zu der Frage, ob Treg-Zellen auch die Alloreaktion im Rahmen der GVHD nach Transplantation inhibieren (102). Diesbezügliche Untersuchungen wurden erstmals von den Leitern unserer und von zwei weiteren Arbeitsgruppen publiziert (102, 181, 182). Im MHC-differenten Transplantationsmodell kann nach letaler Bestrahlung und Transplantation von T-Zell-depletiertem KM ein rasches und komplikationsloses Anwachsen der Spenderhämatopoese erreicht werden. Die Ko-Transplantation von geringen Mengen konventioneller T-Zellen löst eine schwere GVHD aus, an der die Tiere aufgrund einer progredienten Darmschädigung sterben. Werden zusätzlich nTreg-Zellen des Spenders im Verhältnis 1:1 mit den Tconv-Zellen verabreicht, sind die Tiere vor der letalen GVHD geschützt und überleben langfristig ohne relevante Organschädigung (102, 181, 183). Diese Studien zeigten, dass Treg-Zellen nicht nur selbst keine GVHD induzieren, sondern Alloreaktionen auch *in vivo* effizient supprimieren (100, 182, 184). Schutz vor GVHD wurde nur durch Spender-Tregs vermittelt, während adoptiv transferierte Empfänger-Tregs keine Wirkung zeigten. Die protektive Wirkung von Tregs basiert auf der Unterdrückung der frühen Expansion alloaggressiver T-Zellen durch Treg-Zellen, was konsekutiv zur Verminderung proinflammatorischer Zytokinspiegel führt und die Akkumulation alloaggressiver T-Zellen in GVHD-Zielorganen deutlich reduziert (102). Außerdem scheinen sie das Engraftment des allogenen Knochenmarks und somit auch die hämatopoetische Rekonstitution zu fördern (184-187).

Die initiale Aktivierung der Tconv Zellen sowie ihre zytotoxische Aktivität werden dagegen nicht unterdrückt, so dass in mehreren Tumormodellen gezeigt werden konnte, dass die gewünschte GVL-Aktivität ko-transplantierte Tconv Zellen nicht vollständig aufgehoben ist (100). Auf Basis dieser tierexperimentellen Studien erscheint der adoptive Transfer von Spender nTreg-Zellen vielversprechend auch für klinische Protokolle zur Prävention und/oder Behandlung der GVHD nach allogener HSZT.

1.5 Zielsetzung

Die allogene HSZT ist eine kurative Therapieoption für Patienten mit hämatologischen Neoplasien, aber mit einem hohen Therapierisiko behaftet. Die GVHD nach allogener HSZT ist für die hohe Morbidität und Mortalität dieses Therapieverfahrens hauptsächlich verantwortlich. Sie wird durch die im Transplantat enthaltenen reifen Spender T-Zellen verursacht, die nach ihrer Aktivierung und Expansion zur Zerstörung typischer Zielorgane, wie Haut, Leber und Darm führen. Daneben führen alloreaktive Spender-T-Zellen aber auch zu Schädigungen sekundärer Lymphorgane und beeinträchtigen hierdurch zusätzlich die ohnehin sehr verzögerte Regeneration des adaptiven Immunsystems nach Transplantation. In der vorliegenden Dissertation sollen die Mechanismen der gestörten B-Zell-Rekonstitution im Rahmen der GVH-Reaktion im murinen Transplantationsmodell analysiert werden. Zusätzlich soll geklärt werden, welchen Einfluss adoptiv transferierte nTreg-Zellen auf die Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation ausüben. In tierexperimentellen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁺ nTreg-Zellen des Spenders keine GVHD induzieren, die durch Tconv Zellen induzierte GVHD jedoch unterdrücken können, ohne zwangsläufig die gewünschten GVL-Effekte zu blockieren (100-102). Es stellt sich also die Frage, ob nTreg-Zellen durch Verminderung der GVHD die Immunrekonstitution fördern oder aufgrund ihrer suppressiven Wirkung eher behindern.

Zur Klärung dieser Fragen wird ein geeignetes Transplantationsmodell etabliert, um im murinen System eine GVHD zu induzieren. Die GVHD Schwere wird anhand klinischer Scores dokumentiert und histologisch bestätigt. Mittels durchflusszytometrischer Quantifizierung von reifen B-Zellen und B-Vorläuferzellen in Blut, Milz und Knochenmark von Transplantatempfängern mit und ohne GVHD soll der Ort der B-Zell-Reifungsstörung identifiziert werden. Anschließend soll in *in vitro* und in *in vivo* Versuchen die Ursache der gestörten B-Zell-Rekonstitution näher charakterisiert werden. Es soll insbesondere geklärt werden, ob die gestörte B-Zell-Rekonstitution in GVHD Tieren allein peripher (sekundäre Lymphorgane) bedingt ist oder bereits auf Ebene der Vorläuferzellen im Knochenmark erfolgt und welche Mechanismen hierzu beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller
2-Mercaptoethanol (Lsg., 50 µM)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH ₄ CL)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CFSE (Lsg., 5 mM)	Fluka, Steinheim, Deutschland
Cortrim E-Saft	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
DAPI (Lsg., 1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA-Dinatriumsalz (0,1 mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Entellan (Eindeckmedium)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FACSClean	BD Heidelberg, Deutschland
FACSflow	BD Heidelberg, Deutschland
FACSRinse	BD Heidelberg, Deutschland
Fixierungs- und Permeabilisierungskit	BD Heidelberg, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCL (1 N)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
HEPES-Puffer (1 M)	PAN, Aidenbach, Deutschland
Imject® Alum	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

L-Glutamin (Lsg., 200 mM)	PAA, Pasching, Österreich
Luziferin	Biosynth, Staad, Schweiz
Maus Referenzserum	Bethyl Lab., Texas, USA
MEM NEAA	PAN, Aidenbach, Deutschland
NaOH (1 N)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Pyruvat (100 mM)	PAN, Aidenbach, Deutschland
PBS (Phosphate buffered saline)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Permeabilisierungspuffer (10x)	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Phosphat-Citrat-Puffer (CPP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	Fluka, Steinheim, Deutschland
TNP-BSA	Biosearch Technologies, Novato, USA
TNP-OVA	Biosearch Technologies, Novato, USA
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin EDTA (0,05 %/0,02 %)	PAN, Aidenbach, Deutschland
Türcks-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.2 Antikörper für FACS

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller
CD11b	IgG2b	M1/70	Ratte	FITC, PE-Cy7	BD, Heidelberg, Deutschland
CD16/CD32	IgG2a	93	Ratte	Purified	BioLegend/Biozol, Eching, Deutschland
CD19	IgG2a	1D3	Ratte (Lew)	FITC, PE-Cy7	BD, Heidelberg, Deutschland
CD19	IgG2a	6D5	Ratte	PE	BioLegend/Biozol, Eching, Deutschland
CD25	IgG1	PC61	Ratte	PE, APC, PE-Cy7	BD, Heidelberg, Deutschland
CD4	IgG2a	RM4-5	Ratte (DA)	FITC, PE, APC, Pacific Blue	BD, Heidelberg, Deutschland
CD40	IgG2a	FGK45.5	Ratte	Purified	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland

CD45.1	IgG2a	A20	Maus	PE, APC	BioLegend/Biozol, Eching, Deutschland
CD45R/B220	IgG2a	RA3-6B2	Ratte	FITC, Pacific Blue	BD, Heidelberg, Deutschland
CD8a	IgG2a	53-6.7	Ratte (Lew)	PerCP	BD, Heidelberg, Deutschland
Gr-1	IgG2b	RB6-8C5	Ratte	APC	eBiosciences, Frankfurt, Deutschland
H2Kd	IgG2a	SF1-1.1	Maus (SJL)	FITC	BioLegend/Biozol, Eching, Deutschland
H2Kd	IgG2a	SF1-1.1	Maus (SJL)	PE	BD, Heidelberg, Deutschland
TCR β	IgG2b	H57-597	Hamster	PE, APC	BD, Heidelberg, Deutschland

2.1.3 Antikörper für ELISA

Goat anti-Mouse IgG2a-HRP	Bethyl Lab., Texas, USA
Goat anti-Mouse IgG3-HRP	Bethyl Lab., Texas, USA
Goat anti-Mouse IgG-Fc-HRP	Bethyl Lab., Texas, USA
Goat anti-Mouse IgM-HRP	Bethyl Lab., Texas, USA
Goat anti-Mouse Kappa Ltch-affinity purified	Bethyl Lab., Texas, USA

2.1.4 Micro Beads für die magnetische Zellseparation

Name	Hersteller
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD19 MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD4 (L3T4) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD90.2 (Thy1.2) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
5 ml FACS-Röhrchen steril oder unsteril	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ USA
96-well-Flachbodenplatten Maxisorp	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

96-well-Rundbodenplatten	Corning/Costar, NY, USA
Deckgläser (20x26 mm, 24x40 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach, Deutschland
Gewebeschwamm	Labonord, Mönchengladbach, Deutschland
Kanülen (0,4; 0,9 mm)	BD Heidelberg, Deutschland
Kombitips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen	Corning, NY, USA
MACS-Separation Säulen (LS, LD)	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
MACS-Separation Siebe	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Petrischalen (100x15 mm)	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning/Costar, NY, USA
Spritzen (1ml, 10 ml)	BD, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Costar, Cambridge, USA
Zellsiebe (70 µm)	Falcon/BD, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ, USA

2.1.6 Geräte

Geräte	Hersteller
ARIA (Zellsorter)	BD, Heidelberg, Deutschland
BD™ LSR II Durchflußzytometer	BD, Heidelberg, Deutschland
ELISA Reader	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Inkubatoren	Heraeus, Hanau, Deutschland
MACS® Multistand	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Megafugen Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Midi-MACS™ (Magnet)	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Mikroskop	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom Frigucot 2800-E	Reichert Jung, Wetzlar, Deutschland
Sterilbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Bestrahlungsgerät Primus 2	Siemens

2.1.7 Mausstämme

Mausstamm	Herkunft
BALB/c	Charles River, Sulzbach, Deutschland
C57BL/6	Charles River, Sulzbach, Deutschland
B6.129S7-Irfng1tm1Agt/J	Eigene Zucht, Ursprung: Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
C57BL/6 Ly5.1	Eigene Zucht, Ursprung: Prof. Dr. Thomas Winkler, Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik, Erlangen, Deutschland
TNFR1/2 k.o.	Dr. Andreas Limmer, Institut für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie, Bonn, Deutschland

Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse im Alter zwischen 6-10 Wochen verwendet.

2.1.8 Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaft	Herkunft
ST-2	Murine, adhärenzte Knochenmark-Stromazelllinie	Prof. Dr. Thomas Winkler, Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik, Erlangen, Deutschland

2.1.9 Medien, Puffer und Lösungen

RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin): Lonza, Verviers/Belgien

5 % RPMI-Medium:

RPMI 1640 Medium

5 % FCS

100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin

10 % RPMI-Medium:

RPMI 1640 Medium

10 % FCS

100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin

Standardmedium:

RPMI 1640 Medium mit folgenden Zusätzen:

2 mM L-Glutamin; 50 µM 2-Mercaptoethanol; 1 mM Natrium-Pyruvate; 1 % NEAA;
100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 10 % FCS; 10 mM HEPES-Puffer

Stromazellmedium:

RPMI 1640 Medium mit folgenden Zusätzen:

2 mM L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 5 % FCS; 10 mM
HEPES Puffer

MACS-Puffer (entgast):

PBS

2 mM EDTA

1 % FCS

FACS-Puffer:

PBS

2 % FCS

ACK-Puffer (6x):

0,155 M NH_4Cl

0,1 M KHCO_3

0,1 mM EDTA-Dinatriumsalz

pH 7,3, ad 500 ml aqua bidest, 0,2 µm sterilfiltriert

ELISA Beschichtungspuffer

PBS

ELISA Blockierungspuffer:

PBS

1 % BSA

ELISA Verdünnungspuffer

PBS

1 % BSA

ELISA Waschpuffer:

PBS

0,2 % Tween20

ELISA Substratpuffer:

1x 0,05 M Phosphat-Citrat Puffer Tablette, pH 5.0

Add 100 ml aqua bidest

ELISA TMB Substratlösung:

1x TMB Tablette

1 ml DMSO

9 ml Substratpuffer

2 µl 30 % H₂O₂**EDTA-Enkalkungslösung:**

250 g Titriplex III

ad 200 ml aqua bidest

unter Rühren auf Heizplatte aufschlemmen

+ 50 ml NaOH (40 %)

ad 800 ml mit aqua bidest

pH mit NaOH (40 %) auf 7,4 einstellen

ad 1000 ml aqua bidest

2.2 Methoden

2.2.1 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt in einer Neubauer-Zählkammer. Um die Zellzahl einer Zellsuspension zu bestimmen, werden die Zellen mit 0,15 % Trypanblau-Lösung gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Ausgezählt wird mit Hilfe eines Mikroskops bei 10-facher Vergrößerung. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Er dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Dadurch kann mit dieser Methode zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Enthält die Zellsuspension noch Erythrozyten wird eine Türks-Lösung verwendet. Die darin enthaltene Essigsäure hämolysiert die Erythrozyten, während die Leukozyten durch den Farbstoff angefärbt werden.

Die Zellzahl wird mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)} = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.2 Isolierung muriner Primärzellen

2.2.2.1 Isolierung von Knochenmarkzellen

Die Maus wird unter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen durch zervikale Dislokation getötet und in 75 % Ethanol getränkt. Das Knochenmark wird aus Femur und Tibia der Hinterläufe gewonnen. Die Knochen werden noch im geschlossenen Zustand mit der Schere gründlich von anhängendem Fett- und Muskelgewebe befreit und in Tubes mit 5 % RPMI-Medium überführt. Unter der Sterilbank trennt man Femur und Tibia und schneidet sie jeweils an beiden Enden auf. In einer vorgekühlten Petrischale mit 5 % RPMI-Medium wird das Knochenmark dann mit Hilfe einer Spritze und einer 0,4 mm Kanüle mit 5 % RPMI-Medium herausgespült und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren mit einer 5ml Pipette vereinzelt. Zur Entfernung größerer Zellaggregate und Knochensplitter wird die Suspension über ein 70 µm Filtersieb in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben, die Petrischale zweimal mit je 10 ml 5 % RPMI-Medium gespült und die Lösung ebenfalls über das Zellsieb pipettiert. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min bei 4 °C wird das Zellpellet in 2 ml 5 % RPMI-Medium resuspendiert und zur Lyse von Erythrozyten mit 3 ml ACK-Puffer (1x) versetzt. Nach der Inkubation für 1 min bei RT wird das Röhrchen mit 10 % RPMI-Medium aufgefüllt und zentrifugiert. Nach dem Waschschrift wird das Pellet in 2 ml 10 % RPMI-Medium resuspendiert und nochmals über ein 70 µm Zellsieb filtriert, mit 10 % RPMI-Medium aufgefüllt und zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen, zur Bestimmung der Zellzahl mit Türks-Lösung verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

2.2.2.2 T-Zell-Depletion von murinen Knochenmarkzellen

Für die Transplantationsversuche wird das Knochenmark T-Zell-depletiert. Für die Depletion wird das MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) System der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) eingesetzt. Mit Hilfe antikörperbeladener magnetischer Beads (anti-CD90.2, Thy 1.2) werden die CD90.2 positiven Zellen aus dem Knochenmark entfernt. Die Zellen werden dafür wie unter **2.2.2.1** isoliert und in 90 µl FACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. Dann erfolgt die Zugabe direkt gekoppelter CD90.2 Microbeads (10 µl pro 10^7 Zellen) und eine

Inkubation für 15 min bei 4 °C. Anschließend werden die Zellen über ein 70 µm Sieb filtriert, mit MACS-Puffer gewaschen und in MACS-Puffer resuspendiert (max. 1×10^8 Zellen/500 µl MACS-Puffer). Durch Einsetzen der Separationssäule mit ihrer Säulenmatrix (bestehend aus ferromagnetischen Stahlpartikeln) in den Permanentmagneten wird ein Hochgradienten-magnetfeld in der Säule induziert. Dadurch können Zellen auch mit einer minimalen Beadbeladung im Magnetfeld festgehalten und separiert werden. Für die T-Zell Depletion wird eine LS-Säule (Separationssäule) verwendet, die vorab mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert wird. Die Zellsuspension wird auf die Säule gegeben und anschließend 3x mit je 3 ml MACS-Puffer gespült. Zellen, die mit den Antikörper-gekoppelten Beads beladen sind, werden von dem Magneten in der Säule zurückgehalten, die anderen Zellen passieren die Säule ungehindert und so befinden sich die T-Zell-depletierten Knochenmarkzellen im Eluat. Zur Zellzahlbestimmung werden die Zellen mit Trypanblau verdünnt und gezählt. Anschließend wird die Zellsuspension mit 10 % RPMI-Medium gewaschen, in 5 % RPMI-Medium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Alle Zentrifugationsschritte werden bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min durchgeführt. Unmittelbar vor der Transplantation wird das T-Zell-depletierte KM erneut mit Trypanblau gezählt und anschließend mit 5 % RPMI-Medium auf die benötigte Zellzahl eingestellt.

2.2.2.3 T- und B-Zell-Depletion von murinen Knochenmarkzellen

Für einen Teil der Versuche wird T- und B-Zell-depletiertes KM verwendet. Hierfür werden die Knochenmarkzellen wie unter **2.2.2.1** isoliert und in 80 µl FACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. Als nächstes werden anti-CD19 und anti-CD90.2 Microbeads (je 10 µl pro 10^7 Zellen) hinzugefügt und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen werden mit MACS-Puffer gewaschen und das Pellet in MACS-Puffer resuspendiert (max. 1×10^8 Zellen/500 µl MACS Puffer). Für die nachfolgende Depletion wird eine äquilibrierte LD-Säule (Depletionssäule) verwendet. Nach dem Waschen der Säule mit 2x je 1 ml MACS-Puffer befinden sich die gewünschten T- und B-Zell-depletierten Knochenmarkzellen im Eluat. Die Zellen werden mit 10 % RPMI-Medium gewaschen und nach der Zellzählung mit 5 % RPMI-Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

2.2.2.4 Isolierung reifer CD19⁺ B-Zellen aus murinen Knochenmarkzellen mittels kombinierter magnetischer und durchflusszytometrischer Zell-separation

Zur Isolierung reifer CD19⁺ B-Zellen aus murinem Knochenmark wird ebenfalls das bereits beschriebene MACS System der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die Knochenmarkzellen werden wie unter **2.2.2.1** isoliert und in 90 µl FACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert.

Anschließend werden anti-CD19 Microbeads (10 μ l pro 10^7 Zellen) hinzugefügt und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wird mit MACS-Puffer aufgefüllt und über ein 70 μ m Zellsieb gegeben. Nach dem Waschschrift wird das Zellpellet in MACS-Puffer resuspendiert (max. 1×10^8 Zellen/500 μ l MACS Puffer) und auf eine äquilibrierte LS-Säule aufgetragen. Nachdem die LS-Säule 3x mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen wurde, wird sie aus dem Magnetfeld genommen und die gebundenen Zellen mit 5 ml MACS-Puffer eluiert. Zur Zellzahlbestimmung wird ein Aliquot entnommen, mit Trypanblau verdünnt und gezählt. Anschließend wird die Zellsuspension abzentrifugiert, das Zellpellet wird in FACS-Puffer aufgenommen (4×10^6 Zellen/100 μ l) und mit anti-CD19-PE (1,5 μ l/ 4×10^6 Zellen) und anti-TCR-APC (1,5 μ l/ 4×10^6 Zellen) gefärbt. Die Zellen werden ein weiteres Mal in FACS-Puffer gewaschen, auf 20×10^6 Zellen/ml in FACS-Puffer eingestellt und mit Hilfe eines Hochgeschwindigkeitszellsorters werden danach CD19⁺TCR⁻ B-Zellen hochrein isoliert. Die Sortierung erfolgt in Tubes mit 200 μ l vorgelegten FCS mit einer Geschwindigkeit von max. 20.000 Ereignissen/sec.

2.2.2.5 Isolierung von murinen Milzzellen

Für die Gewinnung von Milzzellen werden die Milzen aseptisch entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in 5 % RPMI-Medium auf Eis gelagert. Unter sterilen Bedingungen wird die Milz in eine Petrischale überführt und vom restlichen Bindegewebe befreit. Danach wird die Milz in eine vorgekühlte Petrischale mit etwa 10 ml 5 % RPMI-Medium gegeben und mit einer gebogenen Pinzette ausgestrichen. Durch auf- und abpipettieren mit einer 5 ml Pipette werden die Zellen aus ihren Zellverbänden gelöst und anschließend über ein 70 μ m Zellsieb in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt (Zellen von max. 3 Milzen/Röhrchen). Die Petrischale wird zweimal mit je 5 ml 5 % RPMI-Medium gespült und die Lösung ebenfalls über das Zellsieb pipettiert. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min bei 4 °C wird das Zellpellet in 2 ml 5 % RPMI-Medium resuspendiert und zur Lyse von Erythrozyten mit 3 ml ACK-Puffer (1x) versetzt. Nach der Inkubation für 1 min bei RT wird das Röhrchen mit 10 % RPMI-Medium aufgefüllt und zentrifugiert. Nach dem Waschschrift wird das Pellet in 2 ml 10 % RPMI-Medium resuspendiert und nochmals über ein 70 μ m Zellsieb filtriert, mit 10 % RPMI-Medium aufgefüllt und zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen, zur Bestimmung der Zellzahl mit Türks-Lösung verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

2.2.2.6 Isolierung von CD4⁺CD25⁺ Treg und CD4⁺CD25⁻ Tconv Zellen aus der Milz mittels kombinierter magnetischer und durchflusszytometrischer Zellseparation

CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen:

Die Milz wird wie in 2.2.2.5 beschrieben aufgearbeitet und in einem ersten Schritt mittels MACS in eine CD25⁺- und CD25⁻ Fraktion aufgetrennt. Dazu werden die Zellen in einer Konzentration von 10⁷ Zellen/100 µl in FACS-Puffer suspendiert und mit anti-CD25-PE (0,1 µg/100 µl/1 x 10⁷ Zellen) für 20 min auf Eis gefärbt. Nach einem Waschschrift wird das Pellet in 90 µl FACS-Puffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert und mit 10 µl anti-PE-Microbeads versetzt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Danach werden die Zellen filtriert (Zellsieb, 70 µm), 1x mit MACS-Puffer gewaschen und in MACS-Puffer auf max. 1 x 10⁸ Zellen/500 µl eingestellt. Für die Anreicherung der CD25⁺ Zellen wird eine mit MACS-Puffer äquilibrierte LS-Säule verwendet. Zur Zellzahlbestimmung wird ein Aliquot entnommen, mit Trypanblau verdünnt und gezählt. Anschließend wird die Zellsuspension abzentrifugiert, das Zellpellet wird in FACS-Puffer aufgenommen (4 x 10⁶ Zellen/100 µl) und mit anti-CD4-PB (1 µl/4 x 10⁶ Zellen) gefärbt. Die Zellen werden ein weiteres Mal in FACS-Puffer gewaschen, auf 20 x 10⁶ Zellen/ml in FACS-Puffer eingestellt und mit Hilfe eines Hochgeschwindigkeitszellsorters werden danach CD25⁺CD4⁺ Treg-Zellen hochrein (>98 %) isoliert. Die Sortierung erfolgt in Tubes mit 200 µl vorgelegten FCS mit einer Geschwindigkeit von max. 20.000 Ereignissen/sec.

CD4⁺CD25⁻ Tconv Zellen:

Die CD25⁻ Fraktion wird gezählt, auf 10⁷ Zellen/90 µl MACS-Puffer eingestellt und mit anti-CD4-Microbeads (10 µl/10⁷ Zellen) versetzt. Die Zellen werden 15 min bei 4 °C inkubiert, gewaschen, in mindestens 500 µl MACS-Puffer resuspendiert (max. 1 x 10⁸ Zellen/500 µl) und auf eine weitere LS-Säule gegeben. Die gebundene CD4⁺-Fraktion wird anschließend mit 5 ml MACS-Puffer eluiert, gezählt und mit 5 % RPMI-Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

2.2.3 Durchflusszytometrische Messungen

2.2.3.1 Analyse von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) können verschiedene Parameter einer Zelle erfasst werden. Neben der Zellgröße und der Granularität ermöglicht die Durchflusszytometrie auch den Nachweis von Oberflächenmolekülen nach

dem Anfärben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Die fluorescent markierten Zellen werden nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung durch die laminare Strömung der Trägerflüssigkeit (Hüllstrom) in die Messküvette geleitet, durch deren konische Form beschleunigt und perlenschnurartig aufgereiht durch den Laserfokus geführt.

Im verwendeten Gerät (LSR II) stehen vier luftgekühlte Laser (488 nm, 409 nm, 633 nm und UV Laser) für die Anregung der Farbstoffe zur Verfügung. Bei der Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs durch Licht des Laserstrahles werden diese kurzfristig auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Rücksprung kommt es zur Emission von Photonen, die vom Computer nach Intensität und Farbe getrennt registriert werden. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Größe („Vorwärts-Streulicht“, FSC) und Granularität („Seitwärts-Streulicht“, SSC) der Zellen gewonnen. So ist es möglich, die in einer Probe enthaltenen Zellen nach der Größe und der Granularität, sowie auf die Fluoreszenzintensität, d.h. auf die Präsenz verschiedener Moleküle gleichzeitig zu untersuchen. Werden unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, so sind Mehrfachbestimmungen möglich, da zwar die Anregungswellenlänge identisch ist, aber die Emissionsspektren der jeweiligen Farbstoffe sich unterscheiden. Als Fluorochrome werden FITC, PE, PerCP, APC, PacificBlue und PE-Cy7, sowie der DNA Farbstoff DAPI verwendet. Somit werden insgesamt für jede Zelle bis zu 9 Parameter ermittelt. Da sich die Wellenlängenbereiche teilweise überlappen (**Tab. 2.1**), muss über optische Interferenzfilter eine Kompensation erfolgen. Die Messungen werden am LSR-II (Becton Dickinson) durchgeführt. Für die Aufnahme der Zellen wird die BD FACS DIVA Software verwendet. Die Auswertung erfolgt mit dem Analyseprogramm FloJo (Tree Star Inc. Ashland).

Fluorochrom	Laser Anregung (nm)	Absorptionsmaxima (nm)	Emmissionsmaxima (nm)
FITC	488	490	525
PE	488	490; 565	578
PerCP	488	490	675
PE-Cy7	488	496; 546	785
Pacific Blue	409	416	455
APC	633	650	661

Tab. 2.1: Absorptions- und Emissionswellenlängen von Fluoreszenzfarbstoffen.

2.2.3.2 Oberflächenfärbung für FACS Analyse

Für die Färbung werden die zu analysierenden Zellen (1×10^6 Zellen) in ein mit FACS-Puffer befülltes FACS-Röhrchen gegeben und abzentrifugiert (1200 rpm, 6 min, 4 °C). Das Zellpellet wird anschließend in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert. Um unspezifische

Bindungen zu minimieren, werden Mauszellen mit blockierendem anti CD16/CD32 Antikörper (1 μ l für 1×10^6 Zellen/50 μ l) 6 min bei 4 °C vorinkubiert. Die Antikörper werden dann in den entsprechenden Konzentrationen zusammen mit 50 μ l FACS-Puffer auf die Zellen gegeben und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die ideale Konzentration der Färbeantikörper wird in Vorversuchen durch Titration bestimmt. Nach der Färbung werden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und das Zellpellet für die anschließende FACS-Messung in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Unmittelbar vor der Färbung wird noch DAPI (1 ng/ml) zugegeben, das in Zellen mit beschädigter Membran eindringt und somit eine lebend/tot-Diskriminierung ermöglicht.

2.2.3.3 FoxP3 Färbung

Nach Anfärbung der Oberflächenmoleküle (s. 2.2.3.2) werden die Zellen in 1 ml Fixierungs/Permeabilisierungslösung (eBioscience) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit 2 ml Permeabilisierungspuffer (eBioscience) gewaschen und für 30 min bei 4 °C mit anti-FoxP3 Antikörper (1 μ g/ 1×10^6 Zellen) gefärbt. Nach einem erneuten Waschschriff mit 2 ml Permeabilisierungspuffer werden die Zellen anschließend mit FACS-Puffer gewaschen und in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Die Zentrifugationsschritte erfolgen bei 1200 rpm (4 °C, 5-10 min).

2.2.4 Kultivierung der murinen Stromazelllinie ST-2

Zur Aussaat eingefrorener Zellen werden diese im Wasserbad (ca. 37 °C) angetaut und im Kryoröhrchen resuspendiert. Die Zellen werden in Stromazellmedium überführt und pelletiert (1200 rpm, 4 °C, 10 min). Nach der Zellzählung mit Trypanblau werden $0,25 \times 10^6$ Zellen/30 ml Stromazellmedium in eine Zellkulturflasche (Wachstumsfläche: 75 cm²) gegeben. Zum Passagieren der adhärenent wachsenden Zellen wird nach ca. einer Woche zunächst das Medium abgenommen. Die semikonfluent gewachsenen Zellen werden anschließend gewaschen. Hierfür wird 10 ml PBS zugegeben, durch leichtes schwenken verteilt und abgesaugt. Anschließend werden die Zellen für 5 min mit 5 ml einer steriler Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden durch ein leichtes Klopfen von der Zellkulturflasche gelöst und in ein 50 ml Falcon überführt. Nach zweimaligem Waschen (1200 rpm, 4 °C, 10 min) mit Stromazellmedium wird das Zellpellet in Stromazellmedium resuspendiert und die Zellen mittels Trypanblau gezählt. Abschließend werden wieder $0,25 \times 10^6$ Zellen/30 ml Stromazellmedium in eine neue Kulturflasche überführt.

Für Versuche entnommene Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung stets auf Eis gehalten. Für die langfristige Aufbewahrung von Zellen werden diese in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml eingefroren. Hierzu werden die geernteten Zellen in 500 μ l (2×10^6 Zellen) kaltem FCS gut resuspendiert und anschließend 500 μ l 20 % DMSO in FCS dazugegeben. Nach dem Überführen der Zellen in Kryoröhrchen werden die Tubes in einer Einfrierbox mit Isopropanol für 24 h bei -80°C gelagert. Die mit Isopropanol gefüllten Einfrierboxen gewährleisten ein definiertes Abkühlen der Zellen um 1°C pro min. Anschließend werden die Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C) überführt.

2.2.5 Kultivierung von Knochenmarkzellen auf einer ST-2 Stromazelllinie

Die ST-2 Zellen werden 24 h vorher von einer Flasche mit semikonfluentem Wachstum geerntet und mit 30Gy bestrahlt. Anschließend werden 15.000 Zellen in 100 μ l Standardmedium pro well ausgesät. Am Folgetag werden Knochenmarkzellen gewonnen (s. 2.2.2.1) und in 3 verschiedenen Konzentrationen (800, 400 und 200 Zellen/well) zusammen mit 1 % IL-7 auf die ST-2 Zellen gegeben. Bei dem verwendete IL-7 handelt es sich um einen Zellüberstand, produziert von Jm-IL7.6-Kulturen (Bereitgestellt durch Prof. Dr. Thomas Winkler, Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik, Erlangen). Pro Konzentration werden 5 Parallelwells angesetzt und für 7 Tage bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen der Parallelwells werden geerntet und vereinigt. Für die anschließende durchflusszytometrische Analyse werden die Zellen mit anti-CD19-PE gefärbt.

2.2.6 Allogene Knochenmarktransplantation im murinen Modell

2.2.6.1 Konditionierung

Die Konditionierung der Mäuse erfolgt durch Bestrahlung. Durchgeführt wird diese durch die Mitarbeiter der Abteilung Strahlentherapie der Universitätsklinik Regensburg. Die Empfängermause werden einen Tag vor der Transplantation mit 900 cGy am Siemens PRIMUS-Linearbeschleuniger (100 cGy/min) bestrahlt.

2.2.6.2 Transplantation

Die zur Transplantation bestimmten Zellen werden kurz vor der Gabe noch einmal gezählt und in einem Volumen von 300 μ l/Injektion in 5 % RPMI-Medium gemischt. Die Tiere werden für einige Minuten mit Rotlicht bestrahlt, um die Durchblutung der Schwanzvene zu

verstärken und dann in einer PVC-Röhre so fixiert, dass ihr Schwanz zugänglich bleibt. Die Injektion erfolgte mit einer 1 ml Spritze und einer 0,4 mm Kanüle in die Schwanzvene der Maus. Die Transplantation erfolgt innerhalb 24 Stunden nach der Bestrahlung.

2.2.6.3 Bewertung der GVHD

Für die Beurteilung des Gesundheitszustandes der Mäuse nach Transplantation wird zweimal wöchentlich ein etabliertes Bewertungsschema (**Tab. 2.2**) nach Cooke *et al.* verwendet (188). Dabei werden das Fell, die Haut, die Körperhaltung, Mobilität und das Gewicht der Mäuse berücksichtigt. Mit einer Skala von 0-2 pro Kriterium erhält man einen maximalen Wert von 10. Nach den an der Universität Regensburg geltenden tierschutzrechtlichen Richtlinien, müssen Mäuse bei Erreichen eines Werts von ≥ 6 , bzw. bei einem Gewichtsverlust $>25\%$ getötet werden. Dieser Tag wird in der Überlebenskurve als Todestag dokumentiert.

	Haut	Fell	Körperhaltung	Aktivität	Gewicht
0.5	Schuppung an Pfote und Ohren	struppiges Fell ventral	leichte Kyphose, nur in Ruhe	Aktivität reduziert	-
1.0	Erythem an Schwanz und Anus	ventrale Querlinien, leicht struppiges Fell dorsal	leichte Kyphose auch bei Bewegung	$>50\%$ des Beobachtungszeitraums um keine Bewegung	10-25% Gewichtsverlust
1.5	offene Läsion	Struppiges Fell $>50\%$ der Oberfläche	Kyphose	Bewegung nur nach Stimulation	-
2.0	multiple offene Läsionen	Gesamtes Fell betroffen, Fellverlust	starke Kyphose, eingeschränkte Beweglichkeit	keine Bewegung, auch nach Stimulation	$>25\%$ Gewichtsverlust

Tab. 2.2: Bewertung der klinischen GVHD nach Cooke *et al.* (188)

2.2.7 Venöse Blutabnahme

Um das Anwachsen der transplantierten Zellen zu überprüfen, wird den Mäusen zu bestimmten Zeitpunkten nach Transplantation venöses Blut aus der lateralen Schwanzvene entnommen. Das Blut wird in einem 5 ml FACS-Röhrchen mit 10 μ l Heparin/4 ml PBS aufgefangen. Anschließend wird das Blut abzentrifugiert. Zur Erythrozytenlyse wird 1 ml ACK (1x) hinzugegeben und 5-8 min bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS werden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und mit den entsprechenden

Antikörpern gefärbt. (s. 2.2.3.2). Die Zentrifugationsschritte werden alle bei 1200 rpm und 4 °C für 6 min ausgeführt.

2.2.8 Immunisierung mit TNP-OVA (T-Zell-abhängige Antigene)

2.2.8.1 Verabreichung der Antigene

Die Mäuse werden mit je 50 µg TNP-OVA immunisiert. Die Lösung wird wie folgt hergestellt. TNP-OVA (Stammlösung: 0,5 mg/ml) wurde mit dem gleichen Volumen Imject Alum[®], welches als Adjuvant diente, vermischt. Den Mäusen wird an Tag 0 und an Tag 14 (boost) 200 µl der Lösung ip. verabreicht.

2.2.9 ELISA

2.2.9.1 Blutentnahme zur Serumgewinnung

Die Blutentnahme erfolgt aus der Schwanzvene. Das Blut wird über Nacht in Eppendorfröhrchen ohne Gerinnungshemmer bei 4 °C inkubiert und danach 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird das Serum vorsichtig vom Blutkuchen abpipettiert und entweder kurzzeitig bei 4 °C oder langfristig bei -20 °C gelagert.

2.2.9.2 Sandwich-ELISA zum Nachweis von murinem IgG und IgM

Der ELISA wird in Maxisorp-ELISA-Platten (96 well) durchgeführt. Zur Beschichtung wird ein polyklonaler anti-maus-kappa-Leichtketten-Antikörper aus der Ziege verwendet. Pro Vertiefung werden 0,1 µg (50 µl einer 2 µg/ml Lösung in PBS) eingesetzt. Die Platte wird 2 h bei 37 °C und dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgt die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Platte durch Zugabe von 200 µl/well einer 1 % BSA/PBS-Lösung für 2 h bei 37 °C. Alle weiteren Inkubationsschritte werden ebenfalls bei 37 °C durchgeführt. Zwischen den Schritten erfolgt ein dreimaliges Waschen der Platten mit Waschpuffer. Anschließend erfolgt die Zugabe der Serumproben oder der Standards. Die Seren werden 1:4000 vorverdünnt und anschließend in einer seriellen 1:5 Verdünnungsreihe (50 µl/well) aufgetragen. Als Standard dient ein Maus-Referenzserum mit bekanntem IgG- und IgM-Gehalt. Als Ausgangskonzentration wurde für 500 ng/ml für IgG und 5000 ng/ml für IgM gewählt. Der Standard wurde ebenfalls in einer seriellen 1:5 Verdünnungsreihe (50 µl/well) aufgetragen. Im nächsten Schritt erfolgte der Nachweis der gebundenen Immunglobuline durch Einsatz des entsprechenden mit HRP- (Meerrettich-

Peroxidase) gekoppelten Ziege anti-Maus IgG bzw. IgM Antikörper (50 µl/well). Die Nachweisantikörper wurden in zuvor ausgetesteten optimalen Konzentrationen von 10 µg/ml (anti-IgG) und 33 µg/ml (anti-IgM) eingesetzt. Als Substrat für die HRP wird 100 µl einer Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Abschließend wird der Substratumsatz mit 50 µl/well einer 2 M H₂SO₄ Lösung gestoppt und die OD bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 650 nm im ELISA-Reader gemessen. Zur Auswertung der Daten wird das Programm SOFTmax verwendet.

2.2.9.3 Antigen (TNP)- spezifischer Sandwich-ELISA

Maxisorp-ELISA-Platten (96 well) werden mit 0,25 µg (50 µl einer 5 µg/ml Lösung in PBS) TNP-BSA für 2 h bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen erfolgt die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Platte durch Zugabe von 200 µl/well einer 1 % BSA/PBS-Lösung für 2 h bei 37 °C. Alle weiteren Inkubationsschritte werden ebenfalls bei 37 °C durchgeführt. Zwischen den Schritten erfolgt ein dreimaliges Waschen der Platten mit Waschpuffer. Die Seren werden 1:100, in einer seriellen 1:3 Verdünnungsreihe aufgebracht (50 µl/well) und für 2 h inkubiert. Im nächsten Schritt werden die Platten mit Ziege anti-Maus IgG Antikörper (50 µl/well) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Detektion und Auswertung erfolgte wie unter 2.2.9.2 beschrieben. Zur besseren Beurteilung der Immunisierungsleistung wurden die erhaltenen Titer mit denjenigen aus vollständig immunisierten (3 Immunisierungen) nicht-transplantierten Kontrolltieren verglichen. Als Referenzwert diente der gemittelte halbmaximale OD-Wert der Kontrolltiere.

2.2.10 Histologie

Für die histologische Analyse nach Transplantation werden entweder zum Todeszeitpunkt oder bei Beendigung des Versuchs an Tag 100 Proben von Haut (Ohr), Kolon, Leber und teilweise auch Milz und Knochen (Femur und Tibia) entnommen. Die Organe werden in Einbettkassetten gelegt und zum fixieren für mindestens 24 h in Formaldehyd (<5 %) eingelegt.

2.2.11 Einbetten von Organen

Die Organe werden anschließend entwässert (durchgeführt von den Mitarbeitern der Abteilung Pathologie der Universitätsklinik Regensburg). Knochenpräparate werden vor dem Einbetten in Paraffin mit einer EDTA-Entkalkungslösung bei 37 °C eine Woche lang

inkubiert. Im Anschluss wird die Entkalkung anhand der Elastizität der Knochen getestet und das Präparat bis zur Einbettung wieder in Formalin überführt. Die Gewebe werden dann in einem passenden Metallblock positioniert und mit heißem Paraffin übergossen und auf einer Kühlplatte ausgehärtet. Die fertigen Blöcke werden vor dem Schneiden mit einem Schlittenmikrotom 24 h bei 4 °C durchgekühlt. Es werden Schnitte von ca. 5 µm Dicke angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen.

2.2.12 Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung

Für die HE-Färbung werden die Präparate in den Färbegestellen manuell in einer Färbereihe gefärbt (**Tab. 2.3**). Nach Entparaffinierung mittels Xylol und einer absteigenden

Schritt	Reagenz	Inkubationszeit
1	Xylol	5 min
2	Xylol	5 min
3	abs. Iso-Propanol	5 min
4	96 % Ethanol	5 min
5	80 % Ethanol	5 min
6	70 % Ethanol	5 min
7	Hämatoxylin	3 min
8	Leitungswasser	5 min
9	Eosin	10 min
10	Leitungswasser	30 sec
11	70 % Ethanol	5 min
12	80 % Ethanol	5 min
13	96 % Ethanol	5 min
14	abs. Iso-Propanol	5 min
15	Xylol	5 min
16	Xylol	5 min

Alkoholreihe erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin. Nach Spülung der Objektträger in Leitungswasser wurde mit Eosin gegengefärbt. Das Eindecken der Schnitte mit Deckgläschen erforderte eine nochmalige Entwässerung der geschnittenen und gefärbten Präparate. Dazu wird die Alkoholreihe in umgekehrter Reihenfolge bis zum Xylol verwendet. Abschließend wurden die Organschnitte mit Hilfe des Schnelleindeckmittels Entellan und Deckgläsern eingedeckt. Dazu wurde ein Tropfen des Eindeckmittels mit einem Glasstab auf dem Deckglas verteilt und fest auf den Objektträger gedrückt, um Luftbläschen zu vermeiden. Nach Trocknung wurden die Schnitte in Präparatemappen aufbewahrt.

Tab. 2.3: Protokoll der HE-Färbung.

2.2.13 Statistik

Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. Für die Ermittlung der statistischen Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen wurde der Zweistichproben Student's t-Test (Unterschiedliche Varianz) oder one-way ANOVA mit

anschließendem post-hoc angewendet. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant, ein Wert $p < 0,001$ als statistisch hochsignifikant angesehen. Zur Analyse der Überlebenskurven von transplantierten Tieren wurde der Kaplan Meier Test (SPSS) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Allogene Knochenmarktransplantation im murinen Modell

Eine Hauptursache für die hohe Morbidität und Mortalität nach allogener Knochenmarktransplantation (KMT) ist die Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (*graft-versus-host disease*, GVHD). Diese wird durch alloreaktive Spender T-Zellen im Transplantat ausgelöst. In vorherigen tierexperimentellen Transplantationsstudien der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nTreg-Zellen des Spenders die frühe Expansion der ko-transplantierten alloreaktiven Tconv-Zellen im Rezipienten unterdrücken und somit einer GVHD entgegenwirken (101).

Des Weiteren wird in der Klinik immer wieder beobachtet, dass Patienten mit GVHD nach allogener KMT eine lang anhaltende Defizienz der B-Zell-Immunität zeigen (189). In einem geeigneten murinen Transplantationsmodell sollten die Mechanismen der gestörten B-Zell-Rekonstitution im Rahmen der GVHD analysiert werden. Zusätzlich wurde untersucht, ob der durch nTreg-Zellen vermittelte Schutz vor GVHD mit einer verbesserten Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation einhergeht. Hierfür wurde ein experimentelles KMT-Modell gewählt, das den Transfer von Immunzellen aus C57BL/6 Mäusen (H-2^b) in MHC-differente BALB/c (H-2^d) Empfängermäuse vorsieht.

3.1.1 Isolierung und Charakterisierung der transplantierten Zellpopulationen

Für die Transplantationen wurden verschiedene Zellpopulationen aus C57BL/6 (H-2^b) Spendermäusen isoliert. Hierzu zählten das T-Zell-depletierte Knochenmark (TZD), CD4⁺CD25⁻ konventionelle T-Zellen (Tconv) und CD4⁺CD25^{high} regulatorische T-Zellen (nTreg). Die Isolierung der einzelnen Zellpopulationen erfolgte überwiegend mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (MACS). nTreg-Zellen wurden zusätzlich mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung hochgradig aufgereinigt. Alle verwendeten Zellpopulationen wurden routinemäßig durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit untersucht. Aus Femur und Tibia beider Hinterläufe der Spendermäuse wurde zuerst das Knochenmark isoliert, aufgereinigt (s. 2.2.2.1) und die darin enthaltenen reifen T-Zellen mittels MACS depletiert. Dies wurde zum einen durchgeführt, um sicher zu stellen, dass die in den Tieren ausgelöste GVHD nur durch die in definierten Mengen zum KM hinzugegebenen Tconv-Zellen induziert wurde. Des Weiteren wurde von Zeng *et al.* gezeigt, dass die im KM

enthaltenen T-Zellen einer GVHD-Entwicklung sogar entgegenwirken können (190). Um die darin enthaltenen T-Zellen vollständig zu entfernen, wurde das Gesamtknochenmark mit CD90.2 Beads inkubiert und über eine magnetische Säule gegeben. CD90 (Thy1) ist ein Antigen, welches sowohl auf Thymozyten als auch auf sämtlichen peripheren T-Lymphozyten exprimiert wird. In Mäusen existieren zwei Allele dieses Antigens, CD90.1 (Thy1.1) und CD90.2 (Thy1.2). In unseren Versuchen wurden KM-Zellen aus C57BL/6 Mäusen verwendet, die das Allel CD90.2 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die erhaltene CD90.2⁻ Fraktion (TZD KM) wurde anschließend mit Antikörpern gegen T-Zellen und B-Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (**Abb. 3.1A**). Vor der Separation sind im KM der Spendertiere etwa 2-5 % CD90.2⁺ T-Zellen enthalten. Durch die Depletion konnten reproduzierbar alle reifen T-Zellen nahezu komplett aus den isolierten Knochenmarkszellen entfernt werden. Der residuelle Anteil der T-Zellen am transferierten KM betrug immer unter 0,4 % (**Abb. 3.1B**).

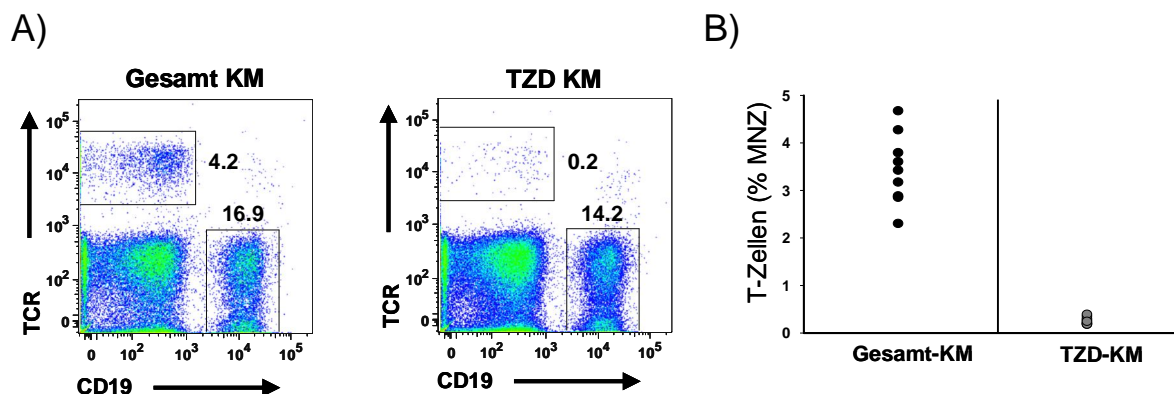


Abb. 3.1: FACS Analyse von Gesamtknochenmark und TZD KM.

Knochenmarkszellen aus C57BL/6 Mäusen wurden mit CD90.2 Beads inkubiert und die T-Zellen anschließend mittels magnetischer Zellseparation entfernt. Die Grafik zeigt A) repräsentative Beispiele vor (Gesamt-KM) und nach (TZD-KM) T-Zell-Depletion und B) zusammengefasste Daten aus n= 9 Aufarbeitungen.

Die für die Transplantation benötigten reifen CD4⁺ Tconv- und nTreg-Zellen wurden aus der Milz isoliert. **Abb. 3.2** zeigt die Zusammensetzung der CD4⁺ T-Zellpopulationen in der Milz. Für die FACS- Analyse werden die Zellen wurden hierfür zuerst für die Oberflächenmarker CD4 und CD25 sowie anschließend intrazellulär für den nTreg charakteristischen Transkriptionsfaktor FoxP3 gefärbt. Unter den CD4⁺ T-Zellen zeigten ca. 10 % sowohl eine sehr hohe CD25 Expression als auch eine hohe FoxP3 Expression. Zusätzlich zeigten ca. 9 % der CD4⁺ T-Zellen eine intermediäre CD25 Expression und ca. 60 % dieser Zellen waren ebenfalls FoxP3⁺. Der Großteil der CD4⁺ T-Zellen in der Milz (ca. 80 %) war CD25⁻ und enthielt nur geringe Mengen an FoxP3⁺ Zellen.

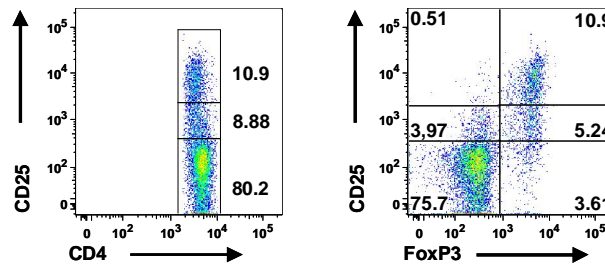


Abb. 3.2: Phänotypische Analyse der nTreg-Zellen.

Isolierte Gesamtmilzzellen aus C57BL/6 Mäusen wurden mit Antikörpern gegen CD25, CD4 und FoxP3 gefärbt und im FACS analysiert. Gezeigt sind die CD25- und FoxP3- Expression der in der Milz vorhandenen CD4⁺ T-Zellen.

Die Aufreinigung der CD4⁺ nTreg- und Tconv-Zellen aus Gesamtmilzzellen der Spendermäuse erfolgte in mehreren Schritten (s. 2.2.5.5). Die Zellen wurden mit einem anti-CD25-PE Antikörper gefärbt und anschließend mittels anti-PE Beads und MACS in eine CD25⁺ und eine CD25⁻ Fraktion separiert.

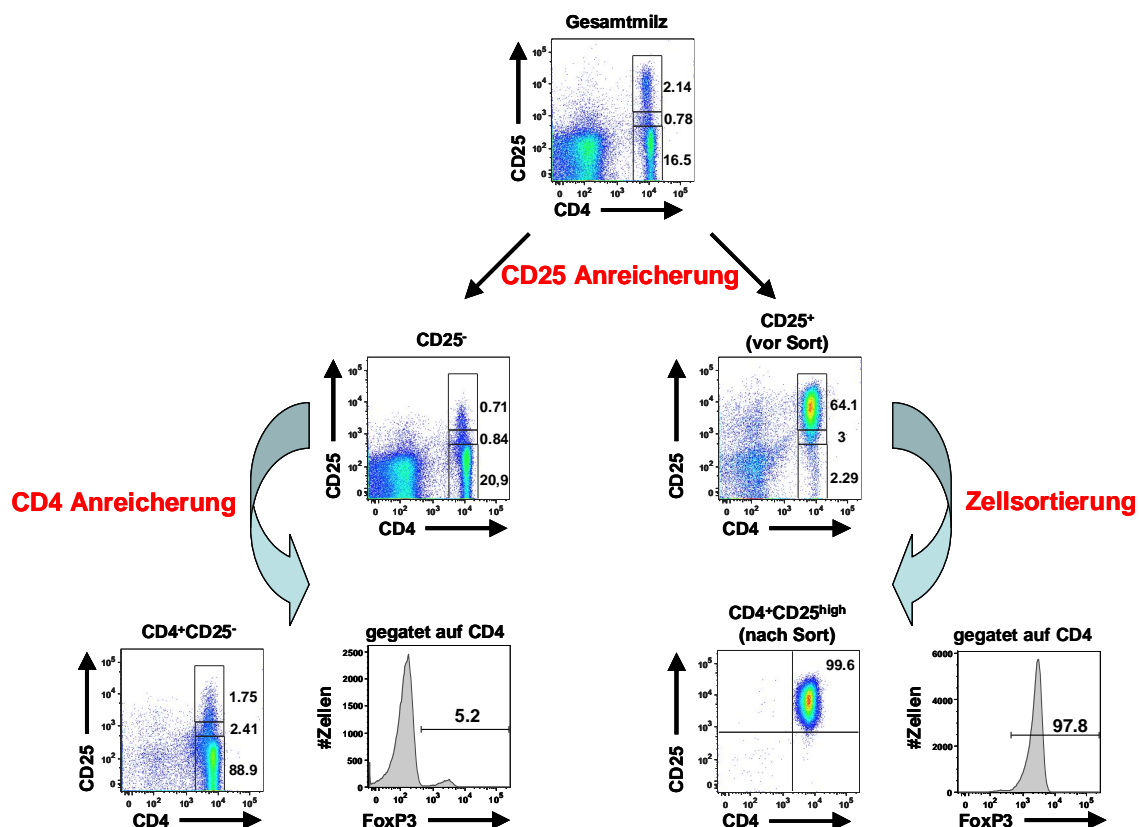


Abb. 3.3: Isolierungsstrategie und FACS Analyse von nTreg- und Tconv-Zellen aus Gesamtmilzzellen.

Gesamtmilzzellen aus C57BL/6 Mäusen wurden mittels MACS in eine CD25⁺ und eine CD25⁻ Fraktion separiert. Aus der CD25⁻ Fraktion wurden über anti-CD4 Beads und anschließende magnetische Zellseparation die CD4⁺CD25⁻ Tconv-Zellen isoliert. Aus der CD25⁺ Fraktion wurden nach Färbung mit anti-CD4 die CD4⁺CD25^{high} nTreg-Zellen über FACS aufgereinigt. Die nTreg- und Tconv-Zellpopulationen wurden nach der Isolierung für FoxP3 gefärbt.

Aus der CD25⁻ Fraktion wurden durch die Zugabe von anti-CD4 Beads und anschließende MACS-Separation die Tconv-Zellen gewonnen, während die nTreg-Zellen aus der CD25⁺ Fraktion mittels FACS aufgereinigt wurden. In dem in **Abb. 3.3** dargestellten Beispiel wurden die CD4⁺CD25^{high} T-Zellen im ersten Anreicherungsschritt von 2,1 % in der Ausgangspopulation auf 64 % in der CD25⁺ Fraktion angereichert. Die anschließende FACS-Aufreinigung resultierte in einer fast 100 % reinen CD4⁺CD25^{high} Population, die zu fast 98 % FoxP3 exprimiert. Die CD25⁻ Fraktion beinhaltete ca. 22-23 % CD4⁺ Zellen, die sich zu 20,9 % aus CD25⁻ und zu ca. 1-2 % aus CD25⁺-Zellen zusammensetzte. Nach der Anreicherung mit anti-CD4 Beads bestand die Tconv Population zu ca. 90-92 % aus CD4⁺ Zellen mit einem Anteil von ca. 4-5 % CD25⁺ Zellen und enthielt ca. 5 % FoxP3⁺ Zellen.

3.1.2 Allogenes KMT Modell

In dem gewählten KMT Modell dienten letal (9Gy) bestrahlte BALB/c (H-2^d) Mäuse als Rezipienten. Ihnen wurden einen Tag nach Bestrahlung $2,5 \times 10^6$ TZD KM-Zellen entweder alleine oder zusammen mit 250.000 nTreg-Zellen aus C57BL/6 (H-2^b) Spendermäusen transplantiert. Weitere zwei Tage später wurden einem Teil der Tiere zusätzlich 250.000 GVHD-induzierende Tconv-Zellen aus C57BL/6 Mäusen transplantiert (**Abb. 3.4**). Die Gabe der nTreg-Zellen zwei Tage vor der Transplantation der Tconv-Zellen erlaubt eine Voraktivierung und Expansion der nTreg-Zellen und steigert dadurch deren protektive Wirkung (191).

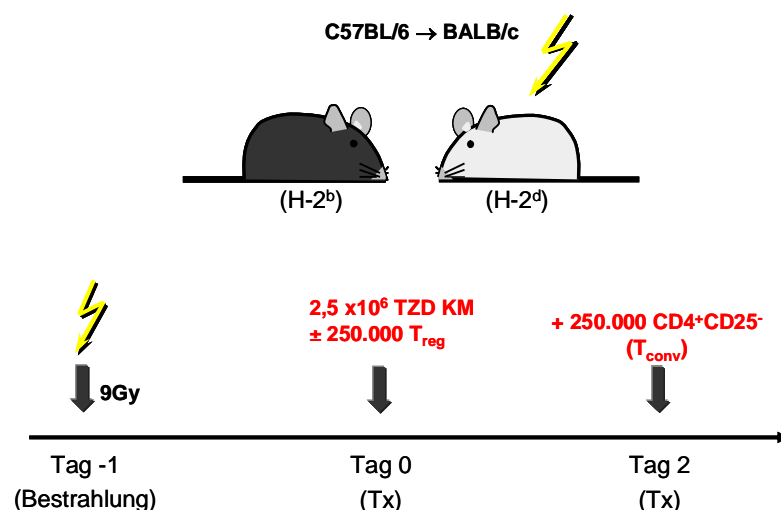


Abb. 3.4: Transplantationsschema.

BALB/c (H-2^d) Mäuse wurden mit 9Gy letal bestrahlt und am Folgetag entweder mit $2,5 \times 10^6$ TZD KM-Zellen alleine, oder zusammen mit 250.000 nTreg aus C57BL/6 (H-2^b) Spendermäusen allogene transplantiert. Zwei Tage später erhielt ein Teil der Tiere zusätzlich 250.000 GVHD-auslösende Tconv-Zellen aus C57BL/6 Mäusen.

Das Überleben der Tiere wurde täglich überwacht, während das Gewicht und die sich entwickelnde GVHD anhand eines klinischen GVHD Scores (s. 2.2.6.3) zweimal wöchentlich bestimmt wurden. Die Gewichtskurven (**Abb. 3.5 A**) der Empfängermäuse nach Knochenmarktransplantation zeigten ein charakteristisches Muster. In den ersten Tagen, der Aplasiephase nach letaler Bestrahlung, kam es in allen drei Gruppen zu einem deutlichen Gewichtsverlust. Durch das Anwachsen des Transplantats mit erneut einsetzender Hämatopoese verbesserte sich zwischen Tag 10 und Tag 20 der Allgemeinzustand aller drei Gruppen und die Tiere nahmen wieder an Gewicht zu. Im weiteren Verlauf zeigten Mäuse, die entweder nur mit TZD KM (KM Gruppe) oder mit TZD KM + Tconv + nTreg-Zellen (Treg Gruppe) allogenen transplantiert worden waren, eine stetige Gewichtszunahme. Im Gegensatz dazu verloren Tiere die TZD KM + Tconv bekommen hatten (GVHD Gruppe) durch die einsetzende Erkrankung ab Tag 19 kontinuierlich an Gewicht. Der unterschiedliche Krankheitsverlauf konnte auch anhand des klinischen GVHD Scores verfolgt werden, in den neben dem Gewicht auch andere Parameter wie die Beschaffenheit des Fells, die Haut, die Körperhaltung und die Mobilität der Mäuse eingehen (**Abb. 3.5 B**). Alle Gruppen zeigten anfangs aufgrund der Bestrahlungsschäden einen leichten Score. Während aber sowohl die KM-, als auch die Treg-Gruppe zu einem späteren Zeitpunkt keinen Score mehr aufwiesen, stieg in der GVHD-Gruppe der Score über den gesamten Beobachtungszeitraum stetig an. In Folge der Erkrankung starben alle Mäuse der GVHD-Gruppe zwischen Tag 20 und Tag 60 nach Transplantation ($p < 0,001$ GVHD- vs. KM-Gruppe) (**Abb. 3.5 C**). Typische Zielorgane der GVHD sind Haut, Leber und Darm. Um den organspezifischen Schweregrad der Erkrankung zu untersuchen, wurden den Mäusen der unterschiedlich transplantierten Gruppen entweder zum Zeitpunkt ihres Todes oder am Ende des Beobachtungszeitraumes Organe entnommen, in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Die Präparate wurden durch einen Pathologen (Dr. Thomas Schubert, früher Institut für Pathologie in Regensburg, seit 2008 in Frankfurt) verblindet begutachtet. Der dafür verwendete Score reichte auf einer Skala von 0-4, die Einstufung erfolgte nach Grass *et al.* und Hill *et al.* (88, 192). In dem verwendeten Mausmodell konnten weder in der Haut noch in der Leber Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Auffällige Unterschiede zeigten sich jedoch im Darm (**Abb. 3.5 D**). Mäuse, die entweder nur mit TZD KM oder TZD KM + Tconv + Treg transplantiert worden waren, wiesen keinen oder nur einen sehr geringen histopathologischen Score in diesem Organ auf, während Mäuse, die im Versuchsverlauf eine GVHD entwickelten (KM + Tconv), einen stark erhöhten histopathologischen Score zeigten.

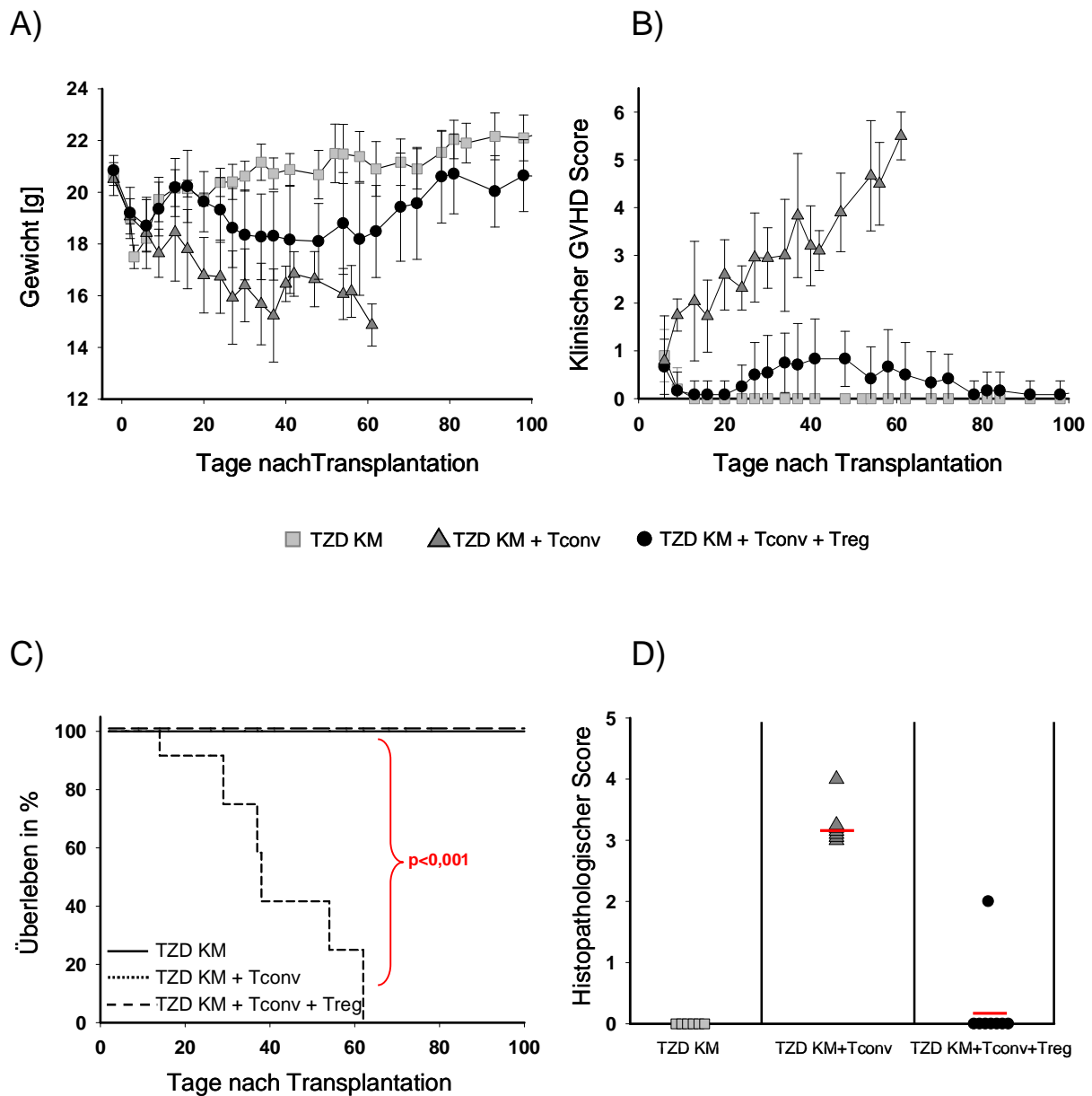


Abb. 3.5: Gewichtsverlauf, klinischer GVHD Score, Überleben und histopathologischer Score von BALB/c Mäusen nach allogener Knochenmarktransplantation.

BALB/c Mäuse wurden mit 9Gy letal bestrahlt und mit TZD KM alleine (■; n= 10), TZD KM + Tconv (▲; n= 12), oder TZD KM + Tconv + Treg (●; n= 12) allogene transplantiert. Dargestellt sind der Gewichtsverlauf (A), der klinische GVHD Score (B), das Überleben (C) und der histopathologische Score im Darm (D). Gezeigt sind die zusammengefassten Daten aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. (A) und (B) zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Der Unterschied hinsichtlich des Überlebens der Tiere zwischen der KM- und der GVHD-Gruppe sowie zwischen der Treg und der GVHD-Gruppe ist statistisch signifikant ($p < 0,001$; nach Kaplan Meier).

3.1.3 Durchflusszytometrische Analyse (FACS) von peripherem Blut, Milz und KM von Empfängertieren nach allogener Knochenmarktransplantation

Empfängermäuse, denen nur TZD KM transplantiert worden war, zeigten schon nach 3 Wochen einen Anteil von 25 ± 7 % CD19⁺ B-Zellen im peripheren Blut, der im Beobachtungszeitraum von 17 Wochen noch bis auf 55 ± 4 % anstieg. Dies entspricht dem normalen B-Zellanteil von 57 ± 10 % im peripheren Blut von naiven C57BL/6 Mäusen. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse die außer TZD KM auch GVHD- auslösende Tconv-Zellen bekommen hatten über den gesamten Beobachtungszeitraum keine B-Zell-Rekonstitution im peripheren Blut (**Abb. 3.6**).

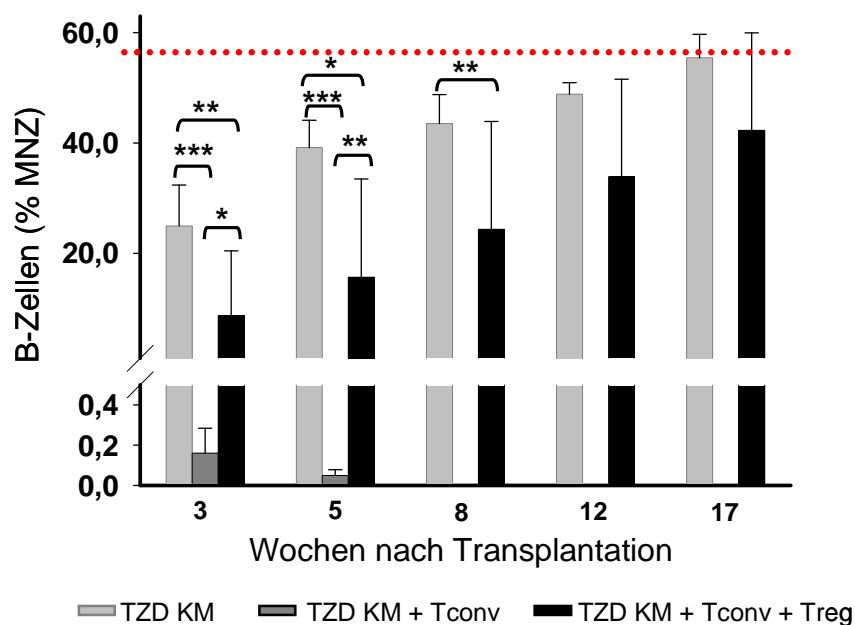


Abb. 3.6: Prozentualer Anteil von CD19⁺ B-Zellen im peripheren Blut nach allogener KMT.

Für die Untersuchung der B-Zell-Rekonstitution im peripheren Blut wurden Empfängermäuse analysiert, denen TZD KM (—; n= 10), TZD KM + Tconv (—; n= 12) oder TZD KM + Tconv + Treg (—; n= 12) transplantiert worden war. Die Detektion erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten nach Transplantation und die Rekonstitution wurde in Form des prozentualen Anteils an B-Zellen unter den MNZ ermittelt. Die Balken zeigen Mittelwerte von n= 10-12 Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an und die Sternchen kennzeichnen die Signifikanz (*p<0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001, one-way ANOVA mit anschließendem post-hoc-Test nach Tukey).

Interessanterweise zeigte die Gruppe, die durch die zusätzliche Gabe von nTreg-Zellen vor einer GVHD geschützt war, anfangs zwar eine gegenüber der KM-Gruppe signifikant verminderte B-Zell-Rekonstitution (8 ± 11 % in Woche 3), der prozentuale Anteil der CD19⁺ B-Zellen im peripheren Blut stieg aber auch in dieser Gruppe im weiteren Versuchsverlauf bis auf 42 ± 17 % an und war damit nicht mehr signifikant unterschiedlich zu dem der Kontrollgruppe (TZD KM). Hiermit wurde deutlich, dass durch die Ko-Transplantation von

nTreg-Zellen zusammen mit Tconv-Zellen nicht nur eine GVHD verhindert, sondern damit einhergehend auch eine Verbesserung der B-Zell-Rekonstitution erzielt werden konnte. Um zwischen Spender- und Empfänger-B-Zellen unterscheiden zu können, wurden die peripheren mononukleären Blutzellen zusätzlich mit Antikörpern gegen die MHC Moleküle H-2^b (Spender) und H-2^d (Empfänger) gefärbt. So konnte gezeigt werden, dass es sich in allen Gruppen bei den detektierten CD19⁺ Zellen schon ab Tag 21 nach Transplantation zu 99 % um B-Zellen des Spenders handelte.

Zur genaueren Bestimmung der Immunzellrekonstitution nach allogener Transplantation wurde im Folgenden die absolute Zellzahl sowie die zelluläre Zusammensetzung von Milz und KM in den Empfängertieren bestimmt. Hierzu wurden den Tieren entweder nach Ablauf des Beobachtungszeitraums von 100 Tagen oder zum Zeitpunkt ihres Versterbens (bzw. ihrer tierschutzrechtlichen Tötung) Milz und KM entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen erfolgte anhand charakteristischer Oberflächenmoleküle in multiparametrischen Färbungen. Granulozyten wurden definiert als Gr1⁺CD11b⁺, Monozyten/Makrophagen als CD11b⁺Gr1⁻, B-Zellen als CD19⁺ und T-Zellen als TCRβ⁺ Zellen.

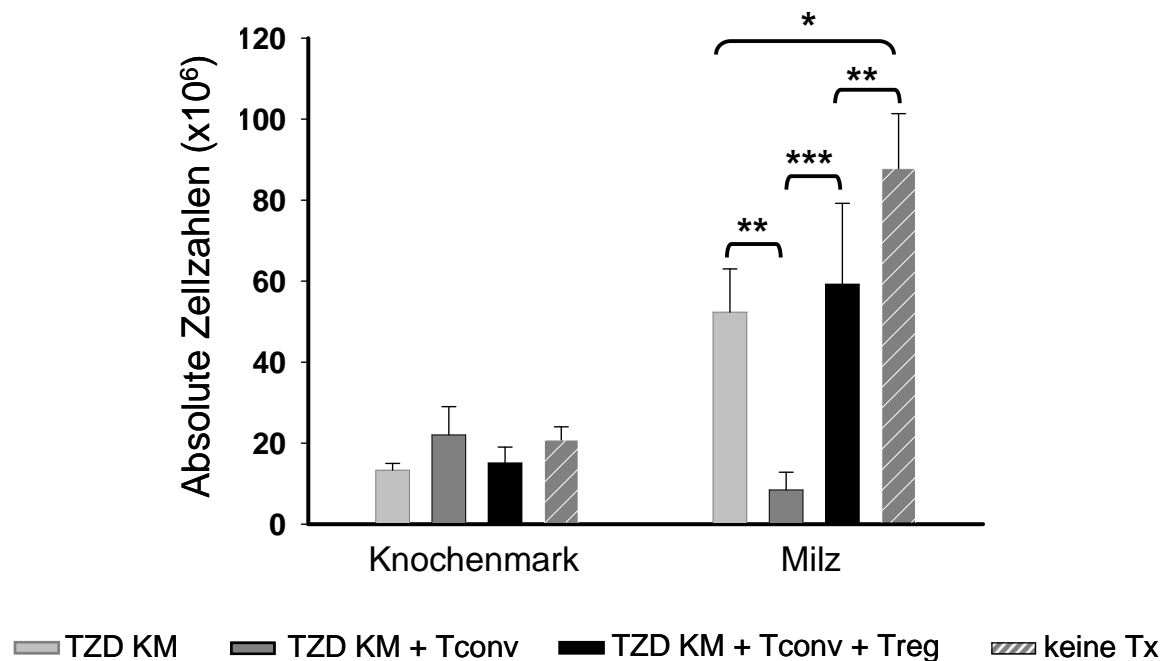


Abb. 3.7: Gesamtzellzahl des KM und der Milz nach allogener Transplantation.

Organentnahme und durchflusszytometrische Analyse erfolgte entweder zum Zeitpunkt des Versterbens im Versuchsverlauf (Tiere der GVHD-Gruppe zwischen Tag 20 und Tag 60 nach Transplantation) oder nach Ablauf des Beobachtungszeitraums von 100 Tagen (TZD KM- und Treg-Gruppe). Die Balken zeigen Mittelwerte von n= 5-8 Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) und die Sternchen kennzeichnen die Signifikanz (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, one-way ANOVA mit anschließendem post-hoc-Test nach Tukey).

Bei der Gesamtzellzahl des Knochenmarks (**Abb. 3.7, links**) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Dabei entsprachen die durchschnittlichen absoluten Zellzahlen der experimentellen Gruppen (KM Gruppe: $13,3 \pm 1,7 \times 10^6$ Zellen; GVHD Gruppe: $22 \pm 6,9 \times 10^6$ Zellen; Treg Gruppe: $15 \pm 3,9 \times 10^6$ Zellen) in etwa denen der unbehandelten C57BL/6 Mäuse ($20,7 \pm 3,3 \times 10^6$ Zellen).

Dagegen ergab die Analyse der Gesamtmilzzellzahlen auffällige Unterschiede sowohl zwischen einzelnen experimentellen Gruppen, als auch im Vergleich zu nicht behandelten Tieren (**Abb. 3.7, rechts**). So zeigten die Gruppen die nur mit TZD KM ($52,3 \pm 10,7 \times 10^6$ Zellen) oder mit TZD KM + Tconv + Treg ($59,3 \pm 20 \times 10^6$ Zellen) transplantiert worden waren, untereinander zwar keine signifikanten Unterschiede, im Vergleich zu den Absolutzellzahlen von naiven C57BL/6 Mäusen ($87,8 \pm 13,6 \times 10^6$ Zellen) waren sie aber beide signifikant verringert. Dagegen lag die Gesamtmilzzellzahl in der GVHD Gruppe mit durchschnittlich nur $8,46 \pm 4,4 \times 10^6$ Zellen nicht nur signifikant unter der der unbehandelten Kontrolle, sondern auch unter der der beiden anderen Gruppen (Kontroll- und Treg-Gruppe). Die Untersuchung der zellulären Zusammensetzung des Knochenmarks (**Abb. 3.8 A**) ergab zwischen der KM- und der Treg-Gruppe weder bei den Granulozyten- ($6,5 \pm 1,4 \times 10^6$ versus $7,8 \pm 3,8 \times 10^6$ Zellen), noch bei den Monozyten- ($0,5 \pm 0,2 \times 10^6$ versus $1,3 \pm 1,1 \times 10^6$ Zellen) oder den B-Zellzahlen ($2,2 \pm 0,3 \times 10^6$ versus $2,9 \pm 0,9 \times 10^6$ Zellen) einen signifikanten Unterschied. Dagegen war die Anzahl der T-Zellen der Treg-Gruppe ($0,27 \pm 0,07 \times 10^6$ Zellen) gegenüber der KM-Gruppe ($0,14 \pm 0,03 \times 10^6$ Zellen) signifikant erhöht. Vergleicht man die zelluläre Zusammensetzung dieser Gruppen mit unbehandelten Tieren, so zeigte sich eine vergleichbare Anzahl an Monozyten, während die Granulozyten-, B- und T-Zellen eine signifikant verringerte Anzahl aufwiesen.

Im Vergleich zu der KM- und der Treg-Gruppe wurde im Knochenmark der GVHD-Gruppe eine signifikant erhöhte Anzahl an Granulozyten ($14,5 \pm 3,8 \times 10^6$ Zellen), die der Anzahl an Granulozyten im KM von naiven C57BL/6 Tieren entsprach, detektiert. Keine signifikanten Unterschiede zu allen Gruppen konnte bei den Monozytenzahlen ($1,8 \pm 1,4 \times 10^6$ Zellen) festgestellt werden. Die absolute Anzahl der T-Zellen ($0,3 \pm 0,1 \times 10^6$ Zellen) im KM der GVHD-Tiere zeigte keinen Unterschied zur KM- oder der Treg-Gruppe, war aber signifikant erniedrigt zu den T-Zellzahlen von C57/BL/6 Mäusen. Entscheidende Unterschiede zwischen den beiden anderen Gruppen und der GVHD-Gruppe wurde allerdings bezüglich der B-Zell-Reihe festgestellt, da im KM der GVHD-Tiere keine CD19⁺ B-Zellen und damit keine Anzeichen einer B-Zell-Rekonstitution nach allogener Transplantation detektiert werden konnte.

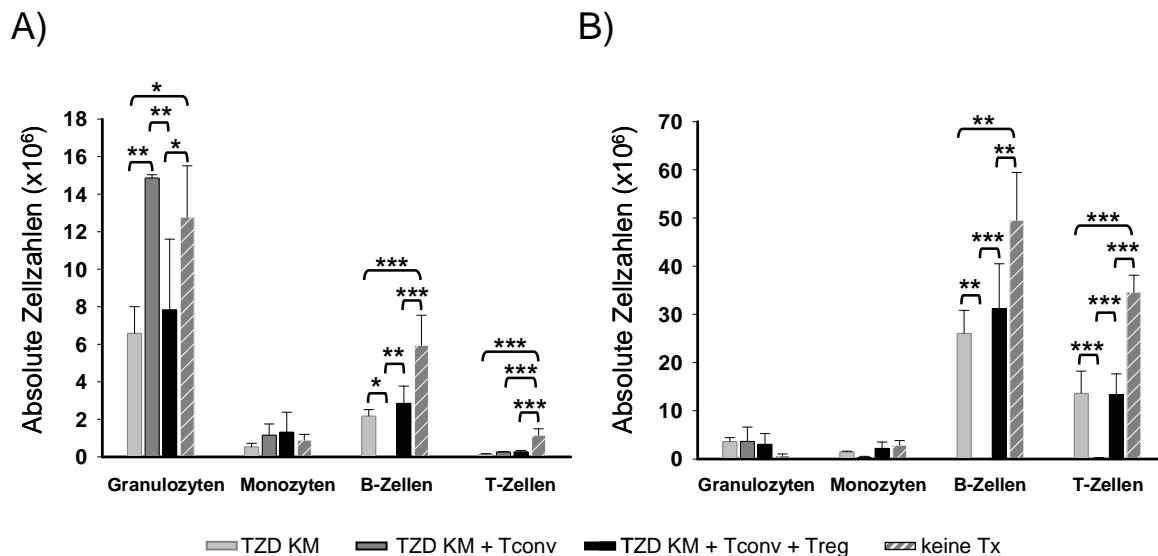


Abb. 3.8: Leukozytäre Zusammensetzung reisolierter Milz- und Knochenmarkzellen nach allogener Transplantation.

Organentnahme und durchflusszytometrische Analyse der zellulären Zusammensetzung von KM (A) und Milz (B) erfolgten entweder zum Zeitpunkt des Versterbens im Versuchsverlauf (Tiere der GVHD-Gruppe zwischen Tag 20 und Tag 60 nach Transplantation) oder nach Ablauf des Beobachtungszeitraums von 100 Tagen (TZD KM- und Treg-Gruppe). Die Balken zeigen Mittelwerte von $n = 5-8$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Zellzahlen beziehen sich auf die gesamte Milz bzw. Femur und Tibia der beiden Hinterläufe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) und die Sternchen kennzeichnen die Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, one-way ANOVA mit anschließendem post-hoc-Test nach Tukey).

Die Tiere der KM-Gruppe und der Treg-Gruppe zeigten hinsichtlich der Anzahl an Granulozyten ($3,6 \pm 0,8 \times 10^6$ versus $3,1 \pm 2,2 \times 10^6$ Zellen), Monozyten ($1,5 \pm 0,14 \times 10^6$ versus $2,2 \pm 1,3 \times 10^6$ Zellen), B-Zellen ($26 \pm 4,7 \times 10^6$ versus $31 \pm 9,3 \times 10^6$ Zellen) und T-Zellen ($13,6 \pm 4,6 \times 10^6$ versus $13,4 \pm 4,3 \times 10^6$ Zellen) in der Milz keine signifikanten Unterschiede (**Abb. 3.8 B**). Im Vergleich zu unbehandelten Tieren lagen die Werte der B- und T-Zellen in den experimentellen Gruppen allerdings deutlich niedriger, während die Anzahl der Granulozyten leicht erhöht und die Anzahl der Monozyten in etwa vergleichbar waren. Die GVHD-Gruppe zeigte auch keine Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen in ihrer Granulozytenzellzahl ($3,9 \pm 2,5 \times 10^6$ Zellen). In der GVHD-Gruppe konnte eine leicht verminderte Monozytenzellzahl ($0,7 \pm 0,5 \times 10^6$ Zellen) festgestellt werden, vor allem wurde aber auch in der Milz ein vollständiges Fehlen der B-Zellen beobachtet. Zusätzlich zur fehlenden Rekonstitution der B-Zellen konnte in der Milz der GVHD Tiere auch nur eine geringe Anzahl an T-Zellen detektiert werden. Die in der GVHD-Gruppe detektierten B- und T-Zellzahlen lagen nicht nur signifikant unter den der unbehandelten Kontrolle, sondern auch unter den der beiden experimentellen Gruppen (KM- und Treg-Gruppe).

3.2 Untersuchungen zur Funktionalität der B-Zellen

3.2.1 Induktion einer humoralen Immunantwort gegen das T-Zell-abhängige Antigen TNP-OVA

Im allogenen Transplantationsmodell konnte sowohl in der KM-Gruppe, als auch in der Treg-Gruppe, eine normale B-Zell-Rekonstitution beobachtet werden, während Mäuse der GVHD-Gruppe weder im peripheren Blut, noch im KM oder der Milz über den gesamten Beobachtungszeitraum eine nennenswerte B-Zell-Entwicklung aufwiesen. Im Folgenden sollte nun anhand der Induktion einer humoralen Immunantwort gegen das T-Zell-abhängige Hapten-Träger-Konjugat TNP-OVA untersucht werden, ob die in den beiden ersten Gruppen (KM- und Treg-Gruppe) neu gebildeten B-Zellen auch funktionell intakt sind. Hierfür wurden die Mäuse an Tag 42, Tag 63 (1. Boost) und Tag 81 (2. Boost) nach Transplantation mit je 50 µg TNP-OVA immunisiert (**Abb. 3.9**).

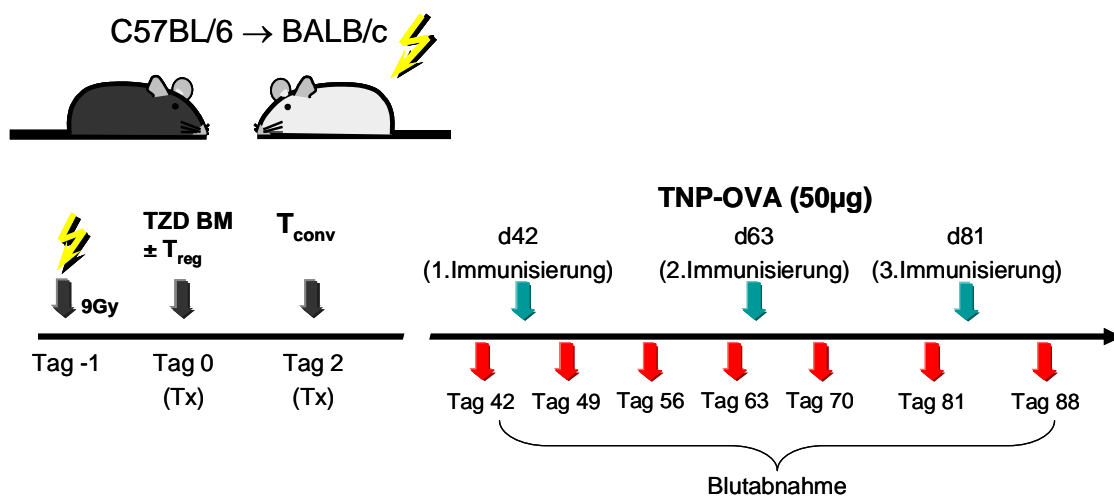


Abb. 3.9: Immunisierungsschema.

BALB/c Mäuse wurden mit 9Gy letal bestrahlt und am Folgetag entweder mit $2,5 \times 10^6$ TZD KM-Zellen alleine, oder zusammen mit 250.000 nTreg aus C57BL/6 Spendermäusen allogene transplantiert. Zwei Tage später erhielt ein Teil der Tiere zusätzlich 250.000 GVHD-auslösende Tconv-Zellen aus C57BL/6 Mäusen. An Tag 42, Tag 63 (1. Boost) und Tag 81 (2. Boost) nach der Transplantation wurden die Mäuse mit Alum-präzipitiertem TNP-OVA immunisiert.

3.2.2 Bestimmung der Gesamt-IgM und IgG Spiegel im Serum von Mäusen nach allogener KMT und Immunisierung mit TNP-OVA

Den transplantierten Mäusen wurde zum Nachweis des Serum-IgM und IgG Gehalts sowie zum Nachweis des TNP-spezifischen IgG zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation (vor, während und nach der Immunisierung) Blut abgenommen (genaue Zeitpunkte (s. **Abb. 3.9**).

Als Positivkontrolle diente das Serum nicht-transplantierte immunisierter C57BL/6 Mäuse. Zusätzlich wurde zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung (Tag 42) der prozentuale Anteil der B-Zellen im peripheren Blut allogen transplantierte Tiere bestimmt. Die Tiere der KM-Gruppe zeigte einen Anteil von $41,6 \pm 9,4$ % B-Zellen, während die Treg-Gruppe 25,8 \pm 14 % rekonstituierte B-Zellen zeigte. Wie erwartet, konnte in den Tieren der GVHD-Gruppe nur ein sehr geringer B-Zellanteil von $0,5 \pm 0,5$ % an Tag 42 detektiert werden.

Vor der Immunisierung konnte im Serum eine den Kontrolltieren (nicht transplantierte C57BL/6 Mäuse) entsprechende Menge an Gesamt-IgM (**Abb. 3.10 A**) sowohl in der KM- als auch in der Treg-Gruppe gemessen werden, die über den gesamten Beobachtungszeitraum weitgehend konstant blieb.

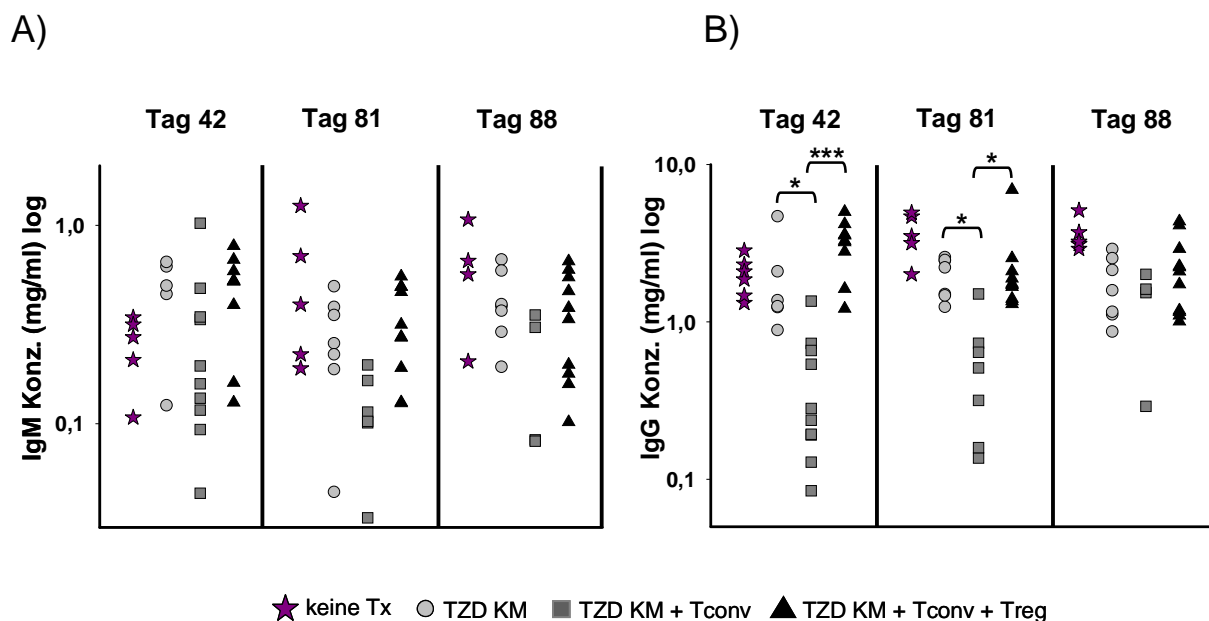


Abb. 3.10: Bestimmung des Gesamt IgM- und IgG Gehalt im Serum allogen transplantierte Tiere.

Im Serum der allogen transplantierte Tiere wurde vor, während und nach der Immunisierung mittels ELISA zu den angegebenen Zeitpunkten der Anteil an Gesamt-IgM und IgG im Serum bestimmt. Die Ergebnisse stammen von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Immunisiert wurden 5-8 Mäuse pro Gruppe. Die Sternchen kennzeichnen die Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, one-way ANOVA mit anschließendem post-hoc-Test nach Tukey).

Auch in der GVHD-Gruppe wurde an Tag 42 noch ein hoher Anteil an Gesamt-IgM detektiert, der im Verlauf jedoch unter den der beiden anderen experimentellen Gruppen absank.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den IgG-Spiegeln der transplantierten Tiere (**Abb. 3.10 B**). Hier konnte vor der Immunisierung an Tag 42 in der KM- und der Treg-Gruppe eine der Kontrollgruppe entsprechende Menge an Gesamt-IgG gemessen werden, die sich in beiden Gruppen bis Tag 88 nicht relevant veränderte. Obwohl im peripheren Blut der GVHD-Gruppe keine B-Zellen mehr detektiert worden waren, konnte an Tag 42 und darüber hinaus noch IgG nachgewiesen werden, der Spiegel lag jedoch signifikant unter dem der beiden anderen Gruppen (KM- und Treg-Gruppe). Zusammenfassend ließ sich also zeigen, dass GVHD-freie Tiere nach allogener Transplantation annähernd normale Immunglobulinspiegel besitzen, während Tiere mit GVHD deutlich erniedrigte Serumspiegel zeigen. Aufgrund der langen Halbwertszeit von Immunglobulinen ist zu vermuten, dass diese noch von den Empfänger-mäusen stammten, da sich in GVHD Tieren keine relevante Zahl an B-Zellen nachweisen ließ.

3.2.3 Bestimmung der humoralen Immunantwort nach Immunisierung mit dem T-Zell-abhängigen Hapten-Träger-Konjugat TNP-OVA

Um Aufschluss über die Funktionalität der rekonstituierten B-Zellen zu erhalten, wurde in den allogenen transplantierten Tieren auch der Titer an TNP-spezifischem IgG im Serum bestimmt. **Tab. 3.1** zeigt die Titer der einzelnen Tiere nach 3 Immunisierungen (Tag 88).

Es zeigte sich, dass 3/3 Tiere der KM-Gruppe und 5/6 der Treg-Gruppe ähnliche Titer zeigten wie nicht transplantierte Kontrolltiere, während von den zwei überlebenden Tieren der GVHD-Gruppe ein Tier keinen Titer aufwies. Die Maus der GVHD-Gruppe mit positivem Titer zeigte in der Blutanalyse eine B-Zell-Rekonstitution und hatte über den gesamten Beobachtungszeitraum nur einen niedrigen GVHD-Score. Dadurch wird deutlich, dass die bei sehr milder GVHD rekonstituierenden B-Zellen funktionell intakt sind. Vor allem zeigen diese Experimente aber, dass der Schutz vor GVHD durch Ko-Transplantation von Treg-Zellen nicht nur zur quantitativen Rekonstitution des B-Zell-Kompartments beiträgt, sondern dass die humorale Immunfunktion durch ko-transplantierte Treg-Zellen nicht inhibiert wird.

Experimentelle Gruppe	Tier #	Titer d88
Keine Tx	1.1	1059
	1.2	946
	1.3	>2700
TZD KM	2.1	1690
	2.2	753
	2.3	1693
TZD KM + Tconv	3.1	<100
	3.2	1153
	3.3	tot
	3.4	tot
	3.5	tot
TZD KM + Tconv + Treg	4.1	1723
	4.2	<100
	4.3	>2700
	4.4	294
	4.5	>2700
	4.6	298

Tab. 3.1: Bestimmung des TNP-spezifischen IgG-Serumtiters nach allogener Transplantation und Immunisierung mit TNP-OVA.

Nach Immunisierung der Transplantatempfänger wurde an Tag 88 nach Transplantation mittels ELISA der Titer an TNP-spezifischen IgG im Serum bestimmt. Immunisiert wurden 3-6 Mäuse pro Gruppe. In den durchgeführten Messungen konnten Titer von 100-2700 detektiert werden. Alle Titer, die unterhalb 100 lagen wurden als <100 und Titer über 2700 wurden als >2700 gewertet. Dargestellt sind die Serumverdünnungen, bei denen der gemittelte halbmaximale OD-Wert der Kontrollseren erreicht wurde.

3.3 Initiale Prozesse der B-Zell-Rekonstitution nach allogener KMT

In den bisherigen Untersuchungen wurde die B-Zell-Rekonstitution in Form einer Momentaufnahme entweder zum Zeitpunkt des Versterbens der transplantierten Tiere (GVHD-Gruppe) oder nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes von 100 Tage betrachtet. In den folgenden Experimenten sollte dagegen die Frühphase der B- und T-Zell-Rekonstitution untersucht werden und darüber hinaus das Schicksal der im KM-Transplantat enthaltenen reifen Spender-B- und T-Zellen aufgeklärt werden.

Dazu wurden letal bestrahlte BALB/c (H-2^d) Empfängertiere entweder mit C57BL/6 TZD KM alleine (Kontrollgruppe) oder mit TZD KM und Tconv-Zellen (GVHD Gruppe) transplantiert und an Tag 7, 14 und 21 die Zellzusammensetzung der Milz und des Knochenmarks analysiert. Um nicht nur grundsätzlich zwischen Empfänger- und Spenderzellen unterscheiden zu können (MHC-Differenz), sondern zusätzlich auch die aus den transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen neu rekonstituierten B- und T-Zellen von den im Transplantat enthaltenen reifen Spenderlymphozyten zu differenzieren (MHC-Identität), wurden kongene Mausstämme als Spender eingesetzt. Die durchflusszytometrische Differenzierung der unterschiedlichen Zellpopulationen war anschließend mittels den in **Tab. 3.2** gezeigten Oberflächenantigenen möglich.

Population	Identifizierung
Spender B-Zellen	CD19 ⁺ , H-2b ⁺ , H-2d ⁻ ,
• kotransplantiert	Ly5.1 ⁻
• rekonstituiert	Ly5.1 ⁺
Empfänger B-Zellen	CD19 ⁺ , H-2d ⁺ , H-2b ⁻ , Ly5.1 ⁻
Spender T-Zellen	TCRβ ⁺ , H-2b ⁺ , H-2d ⁻ ,
• kotransplantiert	Ly5.1 ⁻
• rekonstituiert	Ly5.1 ⁺
Empfänger T-Zellen	TCRβ ⁺ , H-2d ⁺ , H-2b ⁻ , Ly5.1 ⁻

Tab. 3.2: Oberflächenantigene für die durchflusszytometrische Differenzierung der B- und T-Zellpopulationen nach allogener Transplantation.

3.3.1 Transplantatzusammensetzung

In einem ersten Schritt wurden Knochenmarkzellen aus C57BL/6 (Ly5.1) Mäusen isoliert und mittels MACS B- und T-Zell-depletiert (BZD/TZD), so dass das Transplantat nur noch myeloische Zellen enthielt. In einem zweiten Schritt wurden reife CD19⁺ B-Zellen aus dem Knochenmark von C57BL/6 wt Mäusen (Ly5.2) isoliert (Anreicherung über MACS, gefolgt von durchflusszytometrischer Aufreinigung) und anschließend im physiologischen Verhältnis mit dem depletierten KM gemischt. Sowohl bei der Lymphozytendepletion des KM als auch bei der B-Zell-Aufreinigung wurde eine Reinheit von >99 % (**Abb. 3.11**).

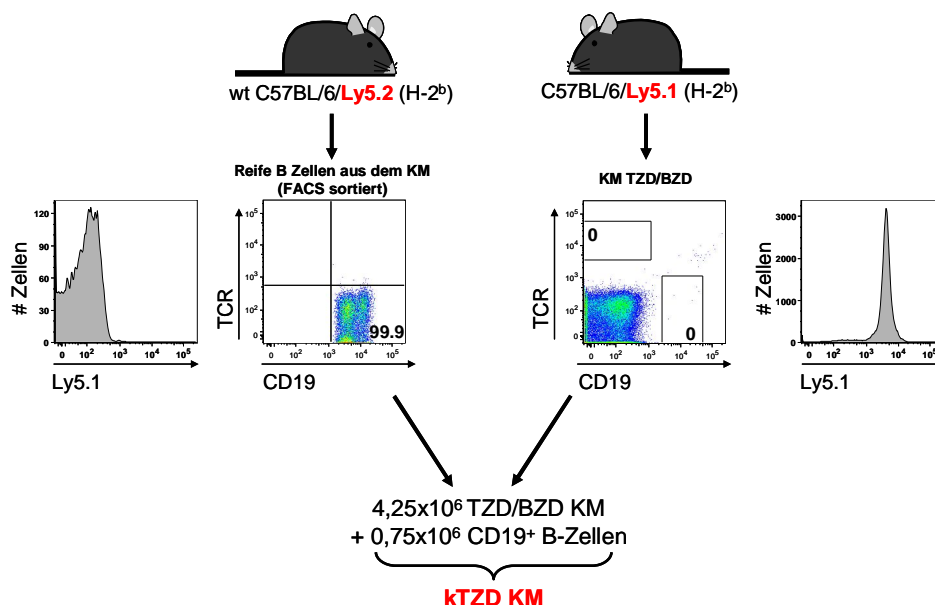


Abb. 3.11: Zusammensetzung des transplantierten Knochenmarks.

Als Quelle für reife KM B-Zellen diente das KM aus C57BL/6 wt (Ly5.2) Tieren. Die Zellen wurden über magnetische- und durchflusszytometrische Zellsortierung in hochreiner Form gewonnen und zusammen mit T- und B-Zell-depletiertem KM von kongenen C57BL/6 Tieren (Ly5.1) in allogene Empfängertiere (BALB/c) transplantiert.

Pro Transplantat wurden $4,25 \times 10^6$ Ly5.1 T2D/B2D KM-Zellen und $0,75 \times 10^6$ Ly5.2 CD19⁺ reife KM B-Zellen gemischt (kT2D KM, kombiniertes T-Zell-depletiertes KM) und i.v. injiziert. Periphere CD4⁺ T-Zellen zur Induktion der GVHD wurden aus C57BL/6 wt (Ly5.2) Mäusen mittels magnetischer Bead-Separation aufgereinigt. Die mit 9Gy letal bestrahlten BALB/c (H-2d) Empfängertiere erhielten an Tag 0 entweder nur 5×10^6 kT2D KM (**s. Abb. 3.11**) (kT2D KM) oder zusätzlich 500.000 Tconv aus wt C57BL/6 (H-2b) Mäusen (kT2D + Tconv). An Tag 7, 14 und 21 wurde jeweils die Milz und das Knochenmark der transplantierten Mäuse isoliert und die Zellzusammensetzung im FACS analysiert (**Abb. 3.12**).

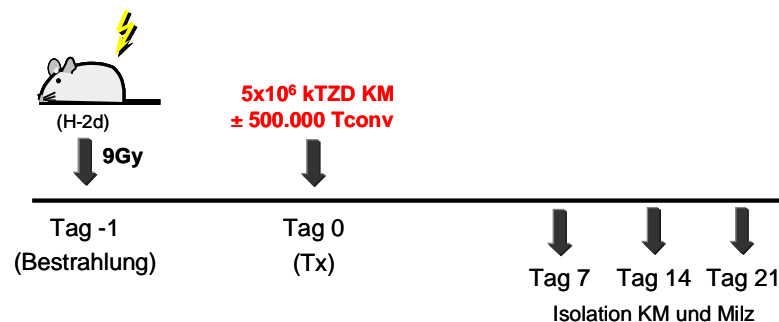


Abb. 3.12: Transplantationsschema.

BALB/c (H-2d) Mäuse wurden mit 9Gy letal bestrahlt und einen Tag später mit 5×10^6 kT2D KM entweder alleine oder zusammen mit 500.000 Tconv-Zellen aus C57BL/6 wt (Ly5.2) Spendermäusen transplantiert. An Tag 7, 14 und 21 nach der Transplantation wurden die Milz und das Knochenmark der transplantierten Mäuse durchflusszytometrisch analysiert.

3.3.2 Monitoring der B- und T-Zell-Rekonstitution früh nach allogener KMT mittels FACS-Analyse von Milz und KM der Empfängertiere

Tiere der Kontrollgruppe (kT2D KM) hatten an Tag 7 im KM eine Gesamtzellzahl von $3,07 \pm 1,7 \times 10^6$ Zellen. Diese stieg bis Tag 14 nach Transplantation durchschnittlich auf $20,3 \pm 14,6 \times 10^6$ Zellen an und veränderte sich bis Tag 21 nur noch geringfügig ($17,1 \pm 5,8 \times 10^6$ Zellen). Tiere der GVHD Gruppe (kT2D KM + Tconv) zeigten mit $3,94 \pm 1,7 \times 10^6$ Zellen am Tag 7 sowie einem Anstieg auf $12,3 \pm 6,1 \times 10^6$ Zellen bis Tag 14 und einer danach ungefähr gleich bleibenden Zellzahl von $12,5 \pm 5,5 \times 10^6$ Zellen an Tag 21 einen ähnlichen Verlauf. Die Gesamtzellzahl im KM der kT2D KM + Tconv Gruppe war zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikant unterschiedlich zur kT2D KM Gruppe (**Abb. 3.13, links**).

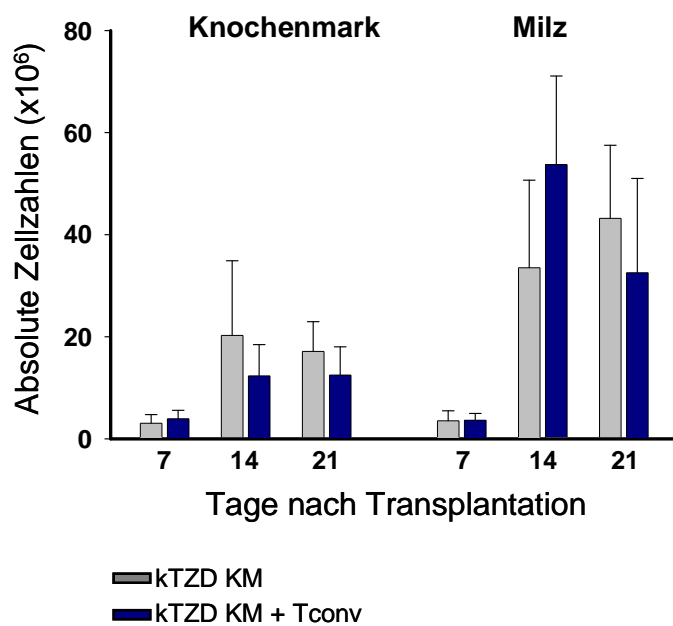


Abb. 3.13: Gesamtzellzahl reisolierter Leukozyten aus dem KM und der Milz.

Organentnahme und durchflusszytometrische Analyse erfolgte an Tag 7, 14 und 21 nach Transplantation. Die Balken zeigen Mittelwerte von $n = 4-8$ Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Zellzahlen beziehen sich auf die gesamte Milz bzw. Femur und Tibia der beiden Hinterläufe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD). Normalwerte in nicht transplantierten Tieren ($n = 6$): KM: $20,7 \pm 3,2 \times 10^6$; Milz: $87 \pm 13,5 \times 10^6$.

Auch die Analyse der Gesamtzellzahl in der Milz (**Abb. 3.13, rechts**) zwischen den experimentellen Gruppen ergab keine auffälligen Unterschiede. So zeigte die Gruppe kTZD KM an Tag 7 eine Gesamtzellzahl von durchschnittlich $3,54 \pm 1,9 \times 10^6$ Zellen in der Milz, die bis Tag 21 kontinuierlich weiter anstieg (Tag 14: $33,5 \pm 17,2 \times 10^6$ Zellen; Tag 21 $43,2 \pm 14,3 \times 10^6$ Zellen). Die Gruppe kTZD KM + Tconv hatte an Tag 7 nach Transplantation eine Gesamtmilzzellzahl von $3,64 \pm 1,3 \times 10^6$ Zellen. Die Zellzahl stieg an Tag 14 auf $53,7 \pm 17,3 \times 10^6$ Zellen, nahm aber bis Tag 21 wieder auf $32,6 \pm 18,5 \times 10^6$ Zellen ab. Zu keinem Zeitpunkt zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Im Unterschied zur Gesamtzellzahl zeigten sich allerdings gravierende Unterschiede bei genauerer Analyse der Zellzusammensetzung von KM und Milz. Im KM der Kontrollgruppe (kTZD KM) konnten an Tag 7 nach Transplantation $0,15 \pm 0,06 \times 10^6$ B-Zellen detektiert werden. Deren Anteil stieg bis Tag 14 nach Transplantation auf $9,72 \pm 9,9 \times 10^6$ Zellen an und blieb bis Tag 21 weitgehend konstant ($5,18 \pm 2,2 \times 10^6$). Durch multiparametrische Färbungen (**Abb. 3.14**) zeigte sich, dass das KM der Kontrolltiere an Tag 7 nach Transplantation noch residuelle Empfänger B-Zellen ($0,46 \pm 0,6 \times 10^5$ Zellen) enthielt, die bis Tag 14 sogar noch auf $1,7 \pm 1,1 \times 10^5$ Zellen zunahmen, am Tag 21 jedoch vollständig aus dem KM der Kontrolltiere verschwunden waren.

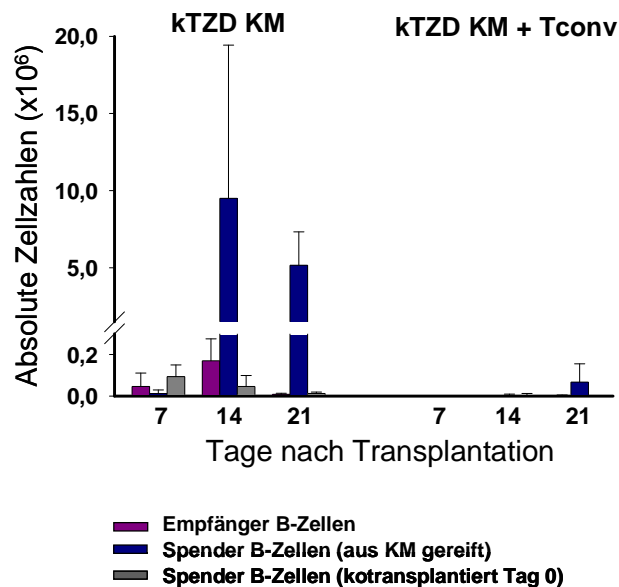


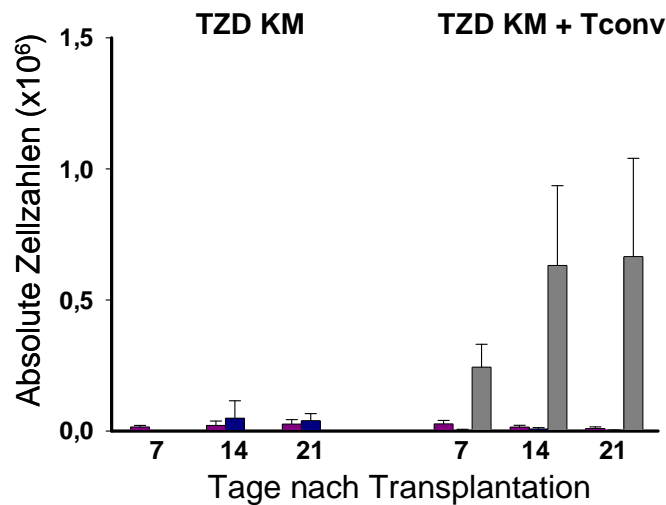
Abb. 3.14: Analyse der B-Zellen im KM trans-plantierter Tiere.

Organentnahme und durchfluss-zytometrische Analyse erfolgte an Tag 7, 14 und 21 nach Transplantation. Die Balken zeigen Mittelwerte von $n=4-8$ Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Zellzahlen beziehen sich auf Femur und Tibia der beiden Hinterläufe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD). B-Zellzahlen in nicht transplantierten Tieren ($n=6$): $5,9 \pm 1,6 \times 10^6$.

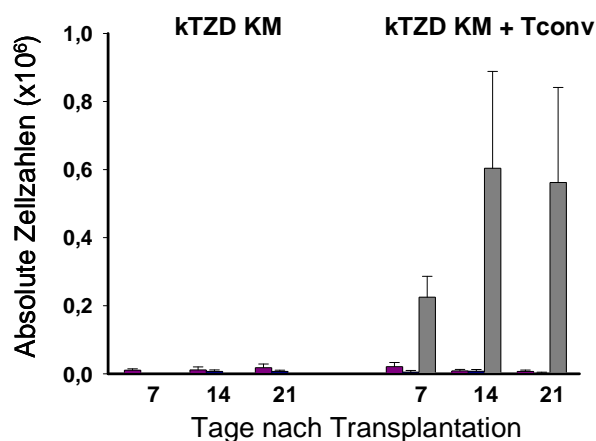
Die Subgruppenanalyse zeigte darüber hinaus, dass die B-Zell-Rekonstitution aus den transplantierten Stamm- oder Vorläuferzellen bereits am Tag 14 erfolgt war ($9,5 \pm 9,9 \times 10^6$ Zellen) und bis Tag 21 keine signifikante Veränderung mehr zeigte. Von den ko-transplantierten B-Zellen konnten an Tag 7 noch $0,93 \pm 0,6 \times 10^5$ Zellen im KM detektiert werden, ihre Anzahl nahm im weiteren Verlauf dann stetig ab (Tag 14: $0,46 \pm 0,5 \times 10^5$ Zellen; Tag 21: $0,12 \pm 0,06 \times 10^5$ Zellen). Im Unterschied hierzu wurde in Mäusen, die nach zusätzlicher Gabe von CD4⁺ T-Zellen GVHD entwickelten (kTSD KM + Tconv Gruppe), weder an Tag 7 nach Transplantation noch zu irgendeinem anderen Zeitpunkt relevante B-Zellzahlen detektiert. Daraus lässt sich schließen, dass die GVHD Empfänger-B-Zellen genauso wie ko-transplantierte reife Spender-B-Zellen eliminiert und die B-Zell-Rekonstitution aus dem KM inhibiert.

Auch bei den T-Zellzahlen konnten zwischen den beiden experimentellen Gruppen deutliche Unterschiede festgestellt werden (**Abb. 3.15 A**). In der Kontrollgruppe konnten an Tag 7 nach Transplantation im KM $0,16 \pm 0,06 \times 10^5$ T-Zellen detektiert werden. Diese stiegen bis Tag 14 auf $0,7 \pm 0,65 \times 10^5$ Zellen an und blieb bis Tag 21 unverändert. Bei den an Tag 7 detektierten T-Zellen handelte es sich fast ausschließlich um residuelle Empfänger T-Zellen ($0,15 \pm 0,06 \times 10^5$ Zellen), deren Anzahl bis Tag 14 anstieg ($0,21 \pm 0,16 \times 10^5$ Zellen) und sich bis Tag 21 nicht mehr veränderte ($0,26 \pm 0,16 \times 10^5$ Zellen). Unterscheidet man bei den detektierten Empfänger-T-Zellen zwischen CD4⁺ (**Abb. 3.15 B**) und CD8⁺ (**Abb. 3.15 C**) T-Zellen, so zeigt sich, dass es sich an Tag 7 ausschließlich um CD4⁺ T-Zellen handelte, während an Tag 14 und Tag 21 sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Empfänger-T-Zellen detektiert wurden. Ab Tag 14 zeigte sich in der Kontrollgruppe eine beginnende Rekonstitution der T-Zellen aus dem transplantierten KM ($0,5 \pm 0,6 \times 10^5$ Zellen), die bis Tag 21 nicht weiter zunahm. Bei den rekonstituierten T-Zellen handelte es sich überwiegend um CD8⁺ T-Zellen.

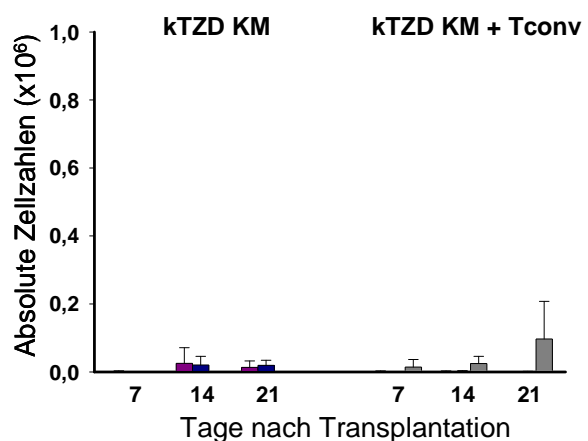
A)



B)



C)



■ Empfänger T-Zellen
 ■ Spender T-Zellen (aus KM gereift)
 ■ Spender T-Zellen (kotransplantiert Tag 0)

Abb. 3.15: Analyse der T-Zellen im KM transplantierten Tiere.

Organentnahme und durchflusszytometrische Analyse erfolgte an Tag 7, 14 und 21 nach Transplantation. Gezeigt sind die Analyse der A) T-Zellen, B) CD4⁺ T-Zellen und C) CD8⁺ T-Zellen im KM der transplantierten Tiere. Die Balken zeigen Mittelwerte von n= 4-8 Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Zellzahlen beziehen sich auf Femur und Tibia der beiden Hinterläufe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD). T-Zellzahlen in nicht transplantierten Tieren (n= 6): Gesamt-T-Zellen: $1,15 \pm 0,34 \times 10^6$; CD4⁺ T-Zellen: $0,35 \pm 0,2 \times 10^6$; CD8⁺ T-Zellen: $0,62 \pm 0,2 \times 10^6$.

In der GVHD Gruppe (kTzd KM + Tconv) konnte im FACS an Tag 7 ein Anteil von $2,74 \pm 0,9 \times 10^5$ T-Zellen detektiert werden, der bis Tag 14 zunahm ($6,54 \pm 3,1 \times 10^5$ Zellen) und anschließend konstant blieb ($6,78 \pm 3,7 \times 10^5$ Zellen). Die darin enthaltene Menge an

Empfänger T-Zellen ging über den ganzen Beobachtungszeitraum stark zurück (Tag 7: $2,74 \pm 0,13 \times 10^5$; Tag 14: $0,14 \pm 0,07 \times 10^5$; Tag 21: $0,09 \pm 0,06 \times 10^5$ T-Zellen). Bei den residuellen T-Zellen handelte es sich überwiegend um CD4⁺ T-Zellen. Von den an Tag 0 ko-transferierten CD4⁺ Spender-T-Zellen konnten an Tag 7 $2,44 \pm 0,9 \times 10^5$ im KM detektiert werden. Die Anzahl dieser Zellen stieg innerhalb einer Woche auf das 2,5fache an ($6,31 \pm 3 \times 10^5$ Zellen) und blieb bis Tag 21 konstant. Eine relevante Population von reifen T-Zellen, die aus den transplantierten Knochenmarkstamm- und Vorläuferzellen im Empfängerthymus neu generiert wurden, konnte nicht nachgewiesen werden.

Neben der Lymphopoese wurde auch die Myelopoese im KM beider experimenteller Gruppen analysiert. Hierfür wurde die Anzahl an Granulozyten (**Abb. 3.16 A**) und Monozyten (**Abb. 3.16 B**) bestimmt.

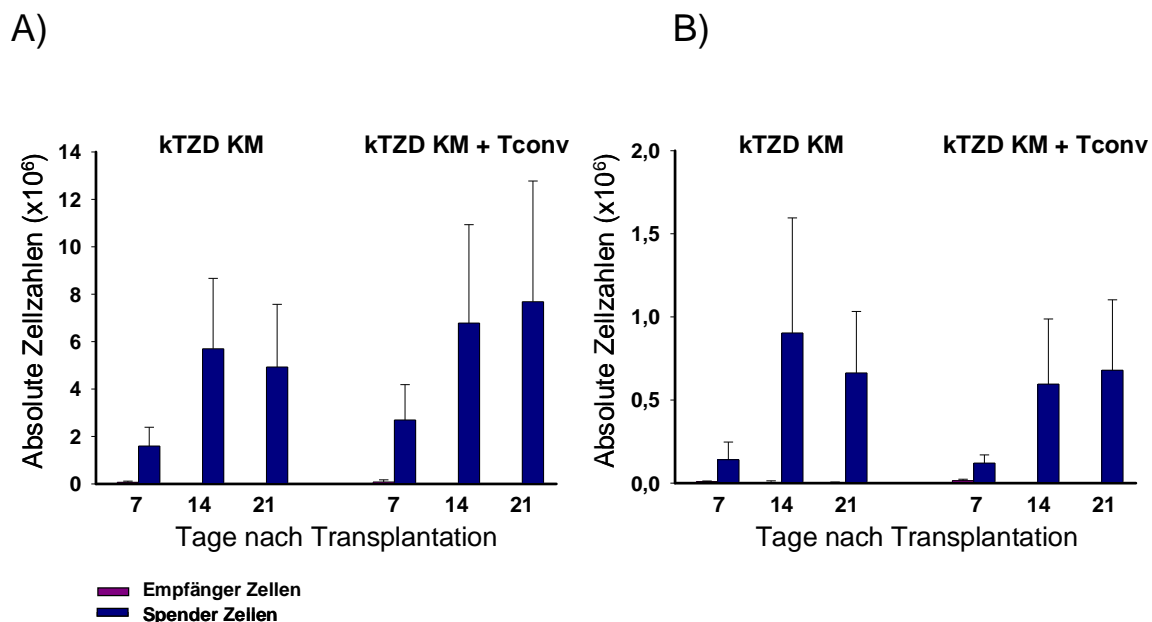


Abb. 3.16: Analyse der Granulozyten und Monozyten transplantiertier Tiere.

Organentnahme und durchflusszytometrische Analyse erfolgte an Tag 7, 14 und 21 nach Transplantation. Dargestellt ist die Analyse der Granulozytenzellzahlen (A) und Monozytenzellzahlen im KM von Kontrolltieren (kTSD KM) oder GVHD Tieren (kTSD KM + Tconv). Die Balken zeigen Mittelwerte von $n = 4-8$ Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Zellzahlen beziehen sich auf Femur und Tibia der beiden Hinterläufe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD). Zellzahlen in nicht transplantierten Tieren ($n = 6$): Granulozyten: $12,8 \pm 2,7 \times 10^6$; Monozyten: $0,9 \pm 0,3 \times 10^6$.

Die Anzahl der Granulozyten und Monozyten nahm in der Kontrollgruppe von Tag 7 (Granulozyten: $1,67 \pm 0,8 \times 10^6$ Zellen, Monozyten: $1,5 \pm 0,1 \times 10^5$ Zellen) bis Tag 14 (Granulozyten: $5,7 \pm 2,9 \times 10^6$ Zellen, Monozyten: $9,11 \pm 0,7 \times 10^5$ Zellen) kontinuierlich zu und zeigte bis Tag 21 nur noch geringfügige Veränderungen (Granulozyten: $4,93 \pm 2,6 \times 10^6$

Zellen, Monozyten: $6,67 \pm 0,4 \times 10^5$ Zellen). Dasselbe Bild zeigte sich auch in der GVHD Gruppe. Hier nahmen beide Zellpopulationen von Tag 7 (Granulozyten: $2,78 \pm 1,5 \times 10^6$ Zellen, Monozyten: $1,35 \pm 0,4 \times 10^5$ Zellen) bis Tag 14 (Granulozyten: $6,78 \pm 4,1 \times 10^6$ Zellen, Monozyten: $0,6 \pm 0,4 \times 10^6$ Zellen) ebenfalls kontinuierlich zu und blieben bis Tag 21 konstant (Granulozyten: $7,68 \pm 5,1 \times 10^6$ Zellen, Monozyten: $0,7 \pm 0,4 \times 10^6$ Zellen). Bei allen Granulozyten und Monozyten der Kontrollgruppe und der GVHD Gruppe handelte es sich ausschließlich um Spenderzellen. Zusätzlich zum KM wurden auch die Milzen der transplantierten Tiere durchflusszytometrisch auf Unterschiede in ihrer Zellzusammensetzung analysiert. An Tag 7 nach Transplantation konnten in der Kontrollgruppe (kTZD KM) $0,65 \pm 0,4 \times 10^5$ B-Zellen detektiert werden (**Abb. 3.17**). Ähnlich wie im Knochenmark stieg die B-Zellzahl dieser Gruppe über den Zeitverlauf stark an (Tag 14: $3,43 \pm 2,9 \times 10^6$, Tag 21: $22,7 \pm 0,9 \times 10^6$ B-Zellen). Unter den in der Milz detektierten B-Zellen waren an Tag 7 noch $0,44 \pm 0,21 \times 10^5$ residuelle Empfänger-B-Zellen, deren Anteil überraschenderweise auch weiter leicht zunahm (Tag 14: $0,19 \pm 0,2 \times 10^6$, Tag 21: $0,21 \pm 0,2 \times 10^6$ B-Zellen).

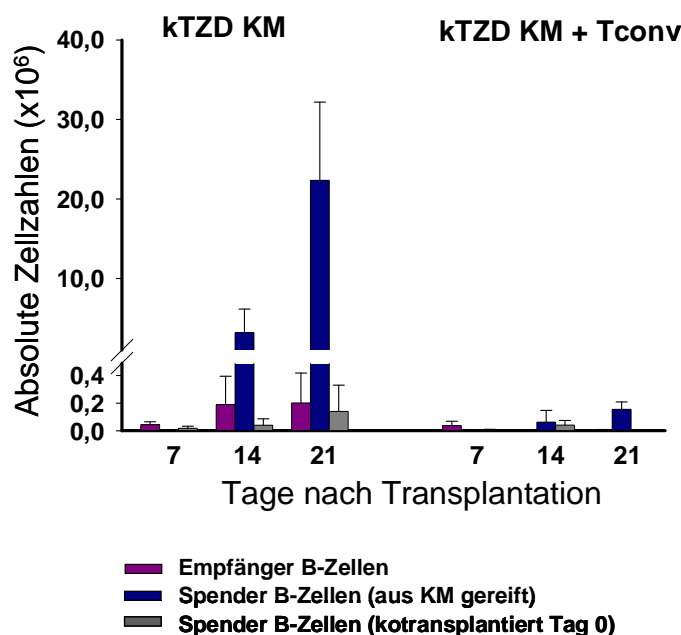


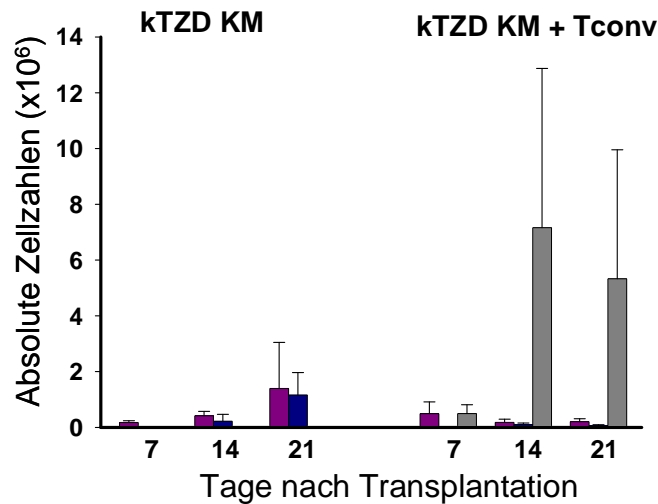
Abb. 3.17: Analyse der B-Zellen in der Milz transplantierten Tiere.

Organentnahme und durchflusszytometrische Analysen erfolgten an Tag 7, 14 und 21 nach Transplantation. Die Balken zeigen Mittelwerte von $n = 4-8$ Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Zellzahlen beziehen sich auf die Milz. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD). B-Zellzahlen in nicht transplantierten Tieren ($n = 6$): $49,5 \pm 9,9 \times 10^6$.

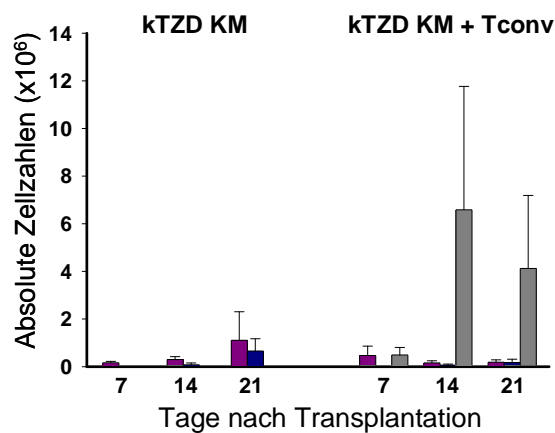
An Tag 7 konnten noch $0,18 \pm 0,2 \times 10^5$ der an Tag 0 ko-transplantierten Spender-B-Zellen detektiert werden, deren Anteil bis Tag 21 leicht anstieg (Tag 14: $0,4 \pm 0,46 \times 10^5$, Tag 21: $1,4 \pm 0,2 \times 10^5$). Eine solide Rekonstitution der B-Zellen aus den transplantierten Stamm- bzw. Vorläuferzellen konnte in der Milz ab Tag 14 beobachtet werden ($3,2 \pm 2,9 \times 10^6$ Zellen) und die Zellzahl stieg bis Tag 21 weiter auf $22,3 \pm 9,8 \times 10^6$ an. Im Unterschied hierzu wurde in GVHD-Tieren (kTZD KM + Tconv Gruppe), wie zuvor schon im KM und peripheren Blut

beobachtet, zu keinem Zeitpunkt eine relevante Rekonstitution der B-Zell-Reihe in der Milz detektiert.

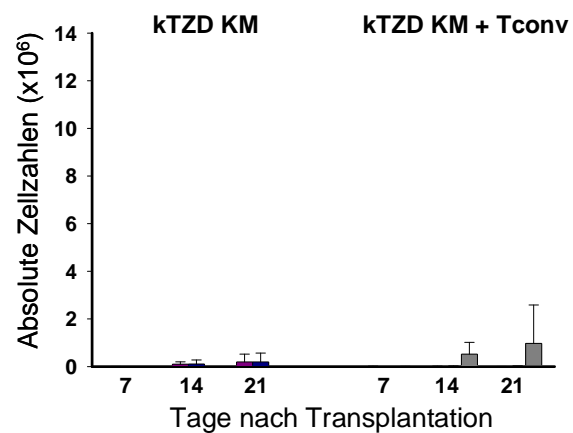
A)



B)



C)



■ Empfänger T-Zellen
 ■ Spender T-Zellen (aus KM gereift)
 ■ Spender T-Zellen (kotransplantiert Tag 0)

Abb. 3.18: Analyse der T-Zellen in der Milz transplantiertier Tiere.

Organentnahmen und durchflusszytometrische Analysen erfolgten an Tag 7, 14 und 21 nach Transplantation. Gezeigt sind die Analyse der A) T-Zellen, B) CD4⁺ T-Zellen und C) CD8⁺ T-Zellen in der Milz der transplantierten Tiere. Die Balken zeigen Mittelwerte von n= 4-8 Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Zellzahlen beziehen sich auf Femur und Tibia der beiden Hinterläufe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD). T-Zellzahlen in nicht transplantierten Tieren (n= 6): Gesamt-T-Zellen: $34,6 \pm 3,5 \times 10^6$; CD4⁺ T-Zellen: $18,1 \pm 4,7 \times 10^6$; CD8⁺ T-Zellen: $17,9 \pm 7,3 \times 10^6$.

Neben den B-Zellen wurden auch die T-Zellsubpopulationen bestimmt. In der Kontrollgruppe konnte anfänglich eine T-Zellzahl (**Abb. 3.18**) von $0,18 \pm 0,07 \times 10^6$ Zellen detektiert werden, die über den Beobachtungszeitraum weiter zunahm (Tag 14: $0,63 \pm 0,15 \times 10^6$, Tag 21: $2,6 \pm 1,4 \times 10^6$). An Tag 7 nach Transplantation wurden immer noch residuelle Empfänger-T-Zellen detektiert, deren Anteil bis Tag 21 eine weitere Zunahme zeigte. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um $CD4^+$ T-Zellen (Tag 7: $1,63 \pm 0,6 \times 10^5$, Tag 14: $2,97 \pm 1,2 \times 10^5$, Tag 21: $11 \pm 1,2 \times 10^5$).

Auch in der GVHD Gruppe nahm die an Tag 7 detektierte T-Zellzahl bis Tag 14 stetig zu (Tag 7: $1 \pm 0,7 \times 10^6$ Zellen; Tag 14: $7,44 \pm 5,7 \times 10^6$ Zellen) und zeigte bis Tag 21 keine gravierenden Veränderungen mehr (Tag 21: $5,6 \pm 4,7 \times 10^6$ Zellen). Vergleichbar mit der Kontrollgruppe konnten an Tag 7 nach Transplantation noch Empfänger-T-Zellen gefunden werden, jedoch nahmen diese kontinuierlich bis Tag 21 ab (Tag 7: $0,5 \pm 0,4 \times 10^6$, Tag 14: $0,18 \pm 0,1 \times 10^6$, Tag 21: $0,2 \pm 0,1 \times 10^6$). Wie auch schon in der Milz der Kontrollgruppe gesehen, handelte es sich bei den in den GVHD-Tieren detektierten Empfänger-T-Zellen ausschließlich um $CD4^+$ T-Zellen. Von den an Tag 7 detektierten T-Zellen stammten ca. 50 % ($0,5 \pm 0,3 \times 10^6$) von den an Tag 0 ko-transplantierten T-Zellen ab. Innerhalb einer Woche stieg deren Anteil weiter stark an auf $7,2 \pm 5,7 \times 10^6$ Zellen und blieb bis Tag 21 weitgehend konstant ($5,3 \pm 4,6 \times 10^6$ Zellen). Eine T-Zell-Rekonstitution aus Vorläuferzellen des KM-Transplantats ließ sich bis Tag 21 in der Milz nicht nachweisen.

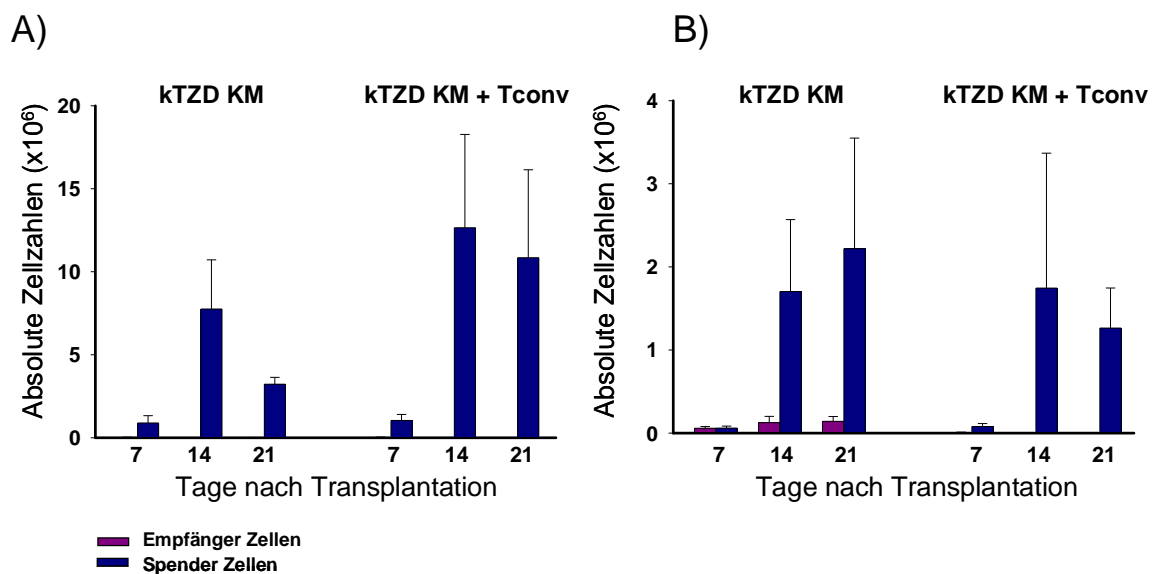


Abb. 3.19: Analyse der Granulozyten und Monozyten transplantiertierter Tiere.

Organentnahmen und durchflusszytometrische Analysen erfolgten an Tag 7, 14 und 21 nach Transplantation. Dargestellt ist die Analyse der Granulozytenzellzahlen (A) und Monozytenzellzahlen in der Milz von Kontrolltieren (kTZD KM) und GVHD Tieren (kTZD KM + Tconv). Die Balken zeigen Mittelwerte von $n = 4-8$ Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Zellzahlen beziehen sich auf die gesamte Milz. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD). Zellzahlen in nicht transplantierten Tieren ($n = 6$): Granulozyten: $0,7 \pm 0,3 \times 10^6$; Monozyten: $2,9 \pm 0,9 \times 10^6$.

Die Granulozytenzellzahlen der beiden experimentellen Gruppen in der Milz zeigten einen ähnlichen Verlauf (**Abb. 3.19 A**). In der Kontrollgruppe wurden an Tag 7 nach Transplantation $0,9 \pm 0,4 \times 10^6$ Granulozyten detektiert, deren Anteil bis Tag 14 auf $7,76 \pm 2,9 \times 10^6$ Zellen anstieg und bis Tag 21 auf $3,23 \pm 0,4 \times 10^6$ Zellen wieder zurückging. In der GVHD Gruppe konnten an Tag 7 ähnliche Granulozytenzellzahlen detektiert werden ($1,1 \pm 0,3 \times 10^6$ Zellen). Auch hier war bis Tag 14 ein Anstieg zu verzeichnen ($12,7 \pm 5,6 \times 10^6$ Zellen), der sich bis Tag 21 nur geringfügig änderte ($10,8 \pm 5,3 \times 10^6$ Zellen). In den Kontrolltieren waren im Gegensatz zur GVHD-Gruppe an Tag 7 noch residuelle Empfängermonozyten vorhanden, deren Zellzahl bis Tag 14 zunahm und anschließend konstant blieb (Tag 7: $0,6 \pm 0,2 \times 10^5$ Zellen; Tag 14: $1,3 \pm 0,7 \times 10^5$ Zellen; Tag 21: $1,4 \pm 0,5 \times 10^5$ Zellen). Die vom Spender stammenden Monozyten nahmen von Tag 7 bis Tag 21 kontinuierlich zu (Tag 7: $0,6 \pm 0,2 \times 10^5$ Zellen; Tag 14: $17 \pm 9 \times 10^5$ Zellen; Tag 21: $22 \pm 13 \times 10^5$ Zellen). Auch in der GVHD-Gruppe stieg die Anzahl der Spender-Monozyten von Tag 7 bis Tag 14 stark an und zeigte bis Tag 21 nur eine geringfügige Abnahme (Tag 7: $0,8 \pm 0,3 \times 10^5$ Zellen; Tag 14: $1,75 \pm 1,6 \times 10^6$ Zellen; Tag 21: $1,27 \pm 0,5 \times 10^6$ Zellen) (**Abb. 3.19 B**).

Zusammengefasst konnte somit gezeigt werden, dass es in den Kontrolltieren ohne GVHD zur raschen Rekonstitution der B-Lymphopoese nach allogener Transplantation kommt. Im Unterschied hierzu zeigt sich in GVHD-Tieren zwar eine Rekonstitution der Myelopoese, es findet allerdings keine Rekonstitution der B- und T-Zell-Reihe statt und selbst ko-transferierte Spender-B-Zellen werden im Rahmen der GVHD eliminiert. Die GVHD verursachenden Spender-T-Zellen expandieren hingegen massiv und können bis Tag 21 nach Transplantation in hohen Mengen in der Milz und in geringen Mengen auch im KM detektiert werden.

3.3.3 Auswirkungen einer zeitverzögert induzierten GVHD auf das bereits rekonstituierte B-Zell-Kompartiment

In den bisherigen Untersuchungen zur B-Zell-Rekonstitution nach allogener KMT wurden die GVHD-auslösenden Tconv-Zellen zu einem sehr frühen Zeitpunkt (Tag 0 oder Tag 2) nach Gabe des TZD KM transplantiert. So konnte gezeigt werden, dass die GVHD eine B-Zell-Rekonstitution in den Empfängermäusen verhindert.

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss die GVHD auf eine bereits rekonstituierte B-Lymphopoese hat. Hierfür wurde die GVHD durch eine verzögerte Gabe der Spender-Tconv-Zellen an Tag 21 ausgelöst. Als Rezipienten dienten auch in diesen Ansätzen letal (9Gy) bestrahlte BALB/c (H-2^d) Mäuse, denen an Tag 0 $2,5 \times 10^6$ TZD KM aus

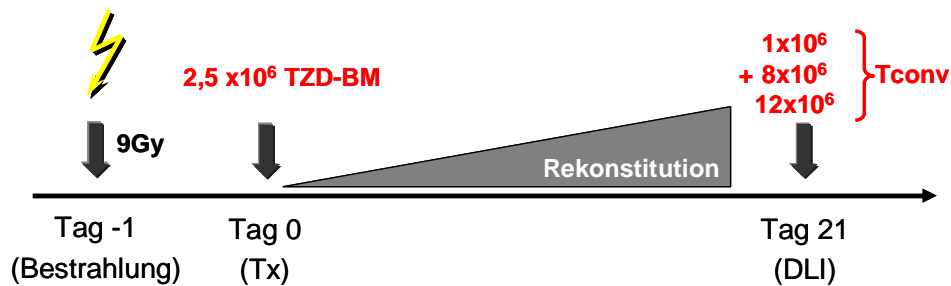


Abb. 3.20: Transplantationsschema.

BALB/c (H-2^d) Mäuse wurden an Tag -1 mit 9Gy letal bestrahlt und an Tag 0 mit $2,5 \times 10^6$ TZD Knochenmarkszellen aus C57BL/6 (H-2^b) Mäusen allogene transplantiert. An Tag 21 nach Transplantation wurden nachträglich 1×10^6 , 8×10^6 oder 12×10^6 GVHD-auslösende allogene Tconv-Zellen aus C57BL/6Ly5.1 (H-2^b) Mäusen transfundiert (donor lymphocyte infusion, DLI).

C57BL/6 (H-2^b) Spendermäusen transplantiert wurden. Die Tiere rekonstituierten in den folgenden 3 Wochen ihre Hämatopoese (inklusive der B-Lymphozyten) aus den transplantierten C57BL/6 Stamm- und Progenitorzellen, bevor ihnen an Tag 21 nach Transplantation unterschiedliche Mengen an C57BL/6 (Ly5.1) Tconv-Zellen zur Induktion einer GVHD injiziert wurden. Ein Teil erhielt keine T-Zellen und diente als Kontrolle (**Abb. 3.20**).

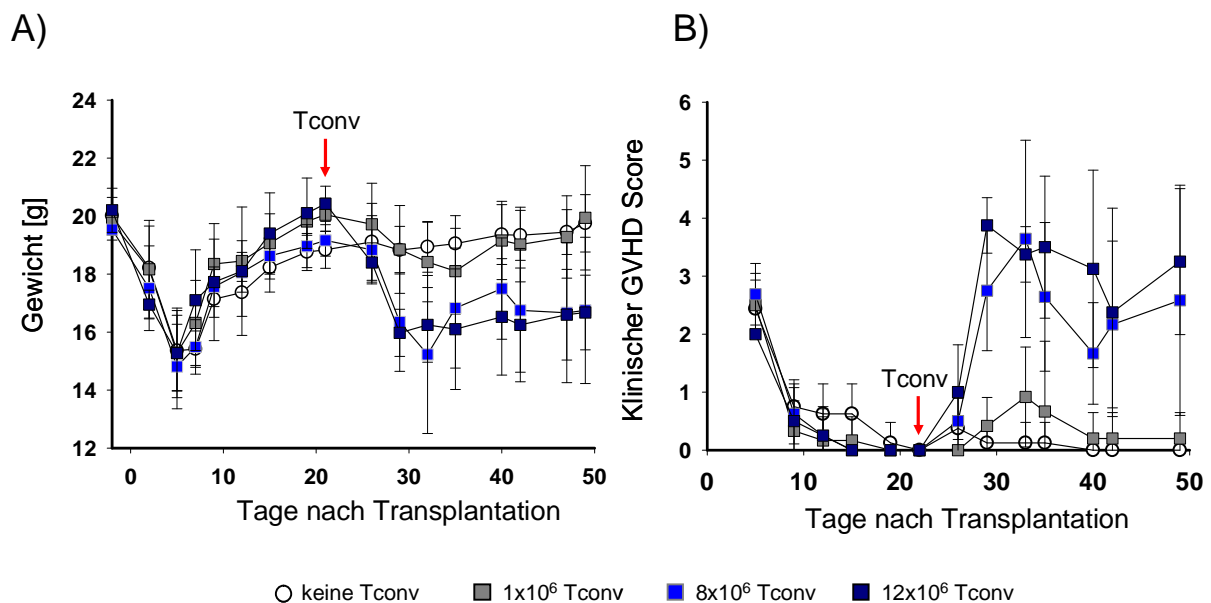


Abb. 3.21: Gewichtsverlauf und klinischer GVHD Score von BALB/c Mäusen nach allogener KMT mit nachträglicher Tconv Gabe an Tag 21.

BALB/c (H-2^d) Rezipienten wurden mit 9Gy letal bestrahlt und mit TZD KM aus C57BL/6 (H-2^b) Mäusen transplantiert. An Tag 21 nach Transplantation wurden den Mäusen nachträglich 1×10^6 (■; n= 6), 8×10^6 (■; n= 8) oder 12×10^6 (■; n= 4) GVHD-induzierende Tconv-Zellen aus C57BL/6Ly5.1 Mäusen (H-2^b) transfundiert. Kontrolltiere erhielten keine Tconv-Zellen (○; n= 3). Dargestellt sind der Gewichtsverlauf (A) und der klinische GVHD Score (B). Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse zweier unabhängig durchgeführter Experimente. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

Um den Verlauf der GVHD zu dokumentieren, wurde, wie für die vorherigen Experiment bereits beschrieben, täglich das Überleben und zweimal wöchentlich das Gewicht der Tiere sowie der klinische GVHD Score bestimmt. **Abb. 3.21** zeigt den Gewichtsverlauf (A) und den klinischen GVHD Score (B) der Mäuse über den Beobachtungszeitraum von 50 Tagen. Nach Gabe von 1×10^6 Tconv-Zellen an Tag 21 nach Transplantation konnte weder im Gewichtsverlauf (**Abb. 3.21 A**) noch im klinischen GVHD Score (**Abb. 3.21 B**) ein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren beobachtet werden. Erst bei einer nachträglichen Gabe von 8×10^6 oder 12×10^6 Tconv-Zellen zeigte sich ein deutlicher und gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikanter Gewichtsverlust, der in beiden Gruppen ähnlich stark ausfiel. Ebenso stieg der GVHD Score in diesen beiden Gruppen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe an.

3.3.4 Durchflusszytometrische Analyse von peripherem Blut, Milz und Knochenmark von BALB/c Empfängertieren nach allogener KMT und zeitverzögerter Tconv Gabe

Um zu untersuchen, wie sich die Entwicklung einer nachträglich an Tag 21 nach KMT induzierten GVHD auf die bereits rekonstituierten B-Zellen auswirkt, wurde das Blut der Empfängermäuse im Zeitraum von Tag 21 (vor Tconv Gabe) bis Tag 49 nach KMT im wöchentlichen Abstand durchflusszytometrisch untersucht (**Abb. 3. 22**).

Der prozentuale Anteil der B-Zellen im peripheren Blut stieg sowohl in der Kontrollgruppe (keine Tconv) als auch in der experimentellen Untersuchungsgruppe mit 1×10^6 Tconv-Zellen (keine klinischen Zeichen einer GVHD) über den Beobachtungszeitraum von 4 Wochen kontinuierlich an (Kontrollgruppe von $17,7 \pm 12,9$ % an Tag 21 auf $42,5 \pm 9,9$ % an Tag 49 nach KMT; 1×10^6 Tconv-Gruppe von $22,3 \pm 4,5$ % an Tag 21 auf $22,3 \pm 4,5$ % an Tag 49 nach KMT) und zeigte keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach der zeitverzögerten Transplantation von 8×10^6 oder 12×10^6 Tconv-Zellen ein rascher und deutlicher Rückgang von bereits rekonstituierten B-Zellen im peripheren Blut. Der Anteil der CD19⁺ B-Zellen in diesen beiden Gruppen lag an Tag 21, vor der Tconv Gabe, bei $30,3 \pm 5,2$ % (8×10^6 Tconv) bzw. $36,3 \pm 9,2$ % (12×10^6 Tconv). Bereits innerhalb der ersten Woche nach Tconv Gabe sank der Anteil der CD19⁺ B-Zellen auf $10 \pm 6,9$ % (8×10^6 Tconv) bzw. $5,9 \pm 1,3$ % (12×10^6 Tconv) und war damit gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Das änderte sich im gesamten Beobachtungszeitraum nicht mehr und so konnten auch nach 4 Wochen im peripheren Blut dieser Tiere nur $14 \pm 13,6$ % (8×10^6 Tconv) bzw. $13 \pm 9,5$ % (12×10^6 Tconv) CD19⁺ B-Zellen detektiert werden.

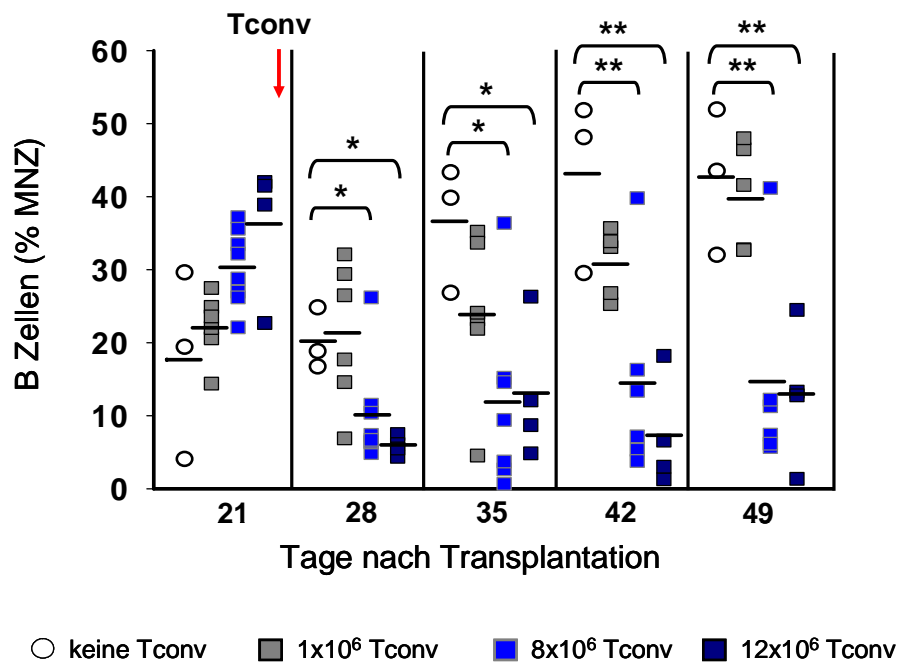


Abb. 3.22: Abnahme des prozentualen Anteils rekonstituierter CD19⁺ B-Zellen im peripheren Blut allogenen transplantierte Empfängertiere in Folge einer zeitverzögerten GVHD Induktion.

BALB/c Empfängertiere wurden mit 9Gy letal bestrahlt und an d 0 mit $2,5 \times 10^6$ TZD KM allogenen transplantiert. An Tag 21 nach Transplantation wurden die Tiere in einzelne Gruppen aufgeteilt und erhielten entweder 1×10^6 (■; n= 6), 8×10^6 (■; n= 8) oder 12×10^6 (■; n= 4) Tconv-Zellen. Kontrolltiere (○; n= 3) erhielten keine Tconv-Zellen. Den Tieren wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (an Tag 21 vor Tconv-Zellgabe) Blut entnommen und durchflusszytometrisch auf den Gehalt an reifen CD19⁺ B-Zellen unter den MNZ untersucht. Gezeigt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten, bei denen insgesamt 3 bis 8 Mäuse pro Gruppe analysiert wurden. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, one-way ANOVA mit anschließendem post-hoc-Test nach Dunnet).

Bei der GVHD werden neben den typischen Zielorganen Haut, Darm und Leber auch lymphatische Organe angegriffen. Es konnte gezeigt werden, dass der Thymus ein direktes Ziel der GVH-Alloreaktivität ist und die Thymusarchitektur dadurch schwer geschädigt wird, so dass die Thymusfunktion beeinträchtigt ist. Deshalb wurde in diesen Experimenten neben der B-Zell-Regeneration auch die Rekonstitution der T-Zellen näher untersucht. Hierfür wurde wie zuvor bei den B-Zellen mittels kongener Marker unterschieden, ob die vorhandenen T-Zellen vom Empfänger, vom transplantierten KM oder von den an Tag 21 nachträglich transfundierten Tconv-Zellen abstammen.

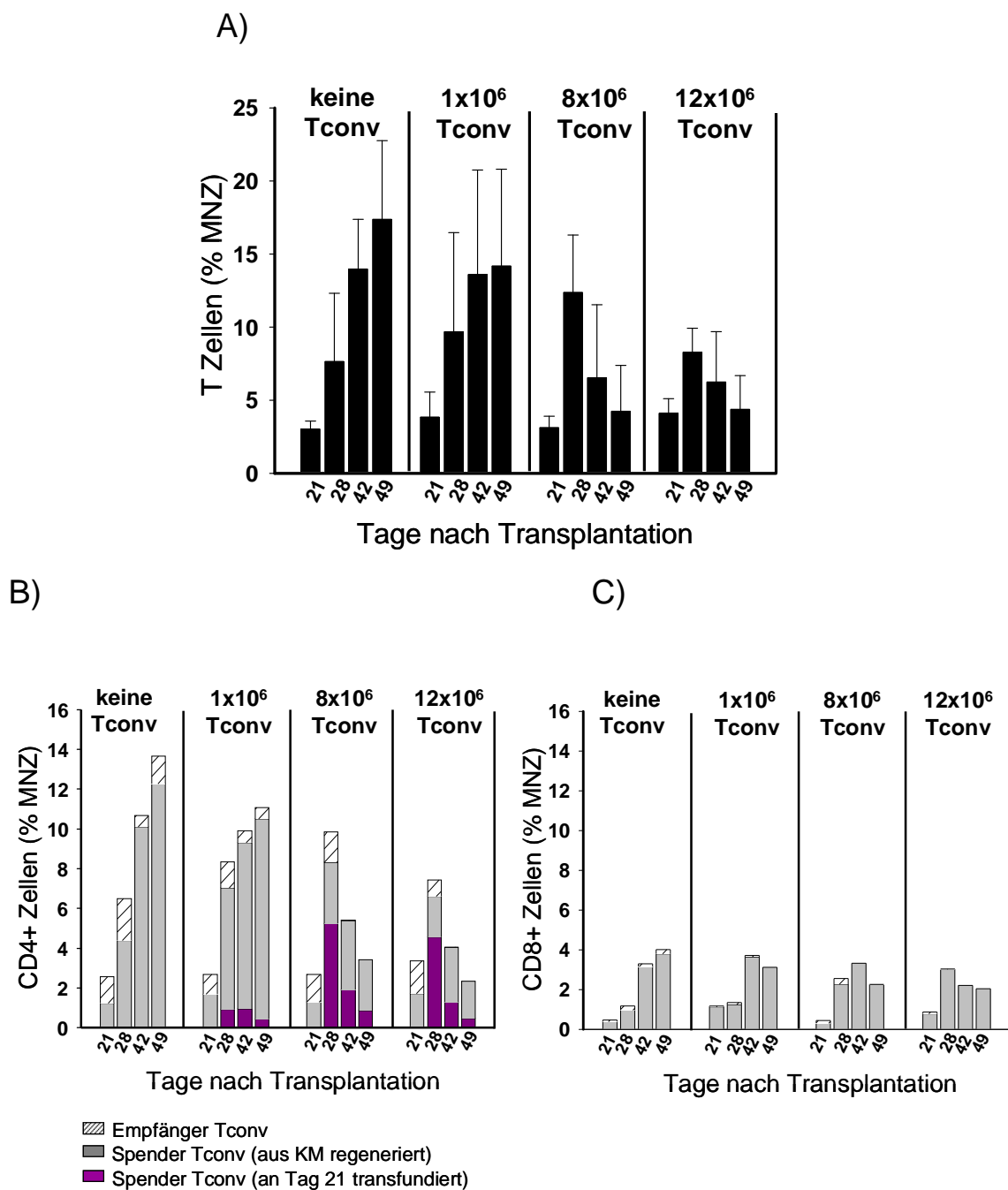


Abb. 3.23: Bestimmung des prozentualen Anteils der T-Zellen und der Abstammung der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut allogren transplantierte Empfänger Tiere nach zeitverzögerter GVHD-Induktion.

BALB/c Empfängertiere wurden mit 9Gy letal bestrahlt und an d 0 mit $2,5 \times 10^6$ TZD KM allogren transplantiert. An Tag 21 nach Transplantation wurden die Tiere in unterschiedliche Gruppen aufgeteilt und erhielten entweder 1×10^6 ($n=6$), 8×10^6 ($n=8$) oder 12×10^6 ($n=4$) Tconv-Zellen. Kontrolltiere ($n=3$) erhielten keine Tconv-Zellen. Den Tieren wurde zu den angegebenen Zeitpunkten (an Tag 21 vor Tconv-Zellgabe) Blut entnommen und durchflusszytometrisch der prozentuale Anteil an T-Zellen (A), CD4⁺- (B) und CD8⁺- (C) T-Zellen im peripheren Blut bestimmt und nach Empfänger-, rekonstituierten Spender- oder verzögert transfundierten Spender-Tconv-Zellen (Transplantation an Tag 21) differenziert. Gezeigt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten, in denen 3 bis 8 Mäuse pro Gruppe analysiert wurden.

Abb. 3.23 A zeigt den prozentualen Anteil der T-Zellen unter den MNZ zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation. Zusätzlich wurden die T-Zellen getrennt nach CD4⁺ (**Abb. 3.23 B**) und CD8⁺ T-Zellen (**Abb. 3.23 C**) analysiert.

In der Kontrollgruppe (keine Tconv) konnte ein kontinuierlicher Anstieg der T-Zellen innerhalb der MNZ zwischen Tag 21 und Tag 49 von $3,03 \pm 0,5$ % auf $17,4 \pm 5,4$ % verzeichnet werden, der vor allem auf die Zunahme der aus dem an Tag 0 transplantierten KM stammenden CD4⁺ T-Zellen zurückzuführen war. Ihr Anteil lag an Tag 21 bei ca. $1,2 \pm 0,5$ % und stieg bis Tag 49 auf ca. $12,3 \pm 3,1$ % an. Die aus dem KM gereiften Spender CD8⁺ T-Zellen zeigten über den Zeitraum ebenfalls eine leichte Zunahme (Tag 21: $0,4 \pm 0,2$ %; Tag 49: $3,8 \pm 1,2$ %). Zusätzlich konnten bis Tag 49 nach Transplantation immer noch residuelle Empfänger-T-Zellen detektiert werden. Hierbei handelte es sich mehr um CD4⁺ ($1,4 \pm 1,4$ %) als um CD8⁺ ($0,2 \pm 0,2$ %) T-Zellen. Auch in der Behandlungsgruppe, die an Tag 21 1×10^6 Tconv transfundiert bekamen, zeigte sich bis Tag 49 ein der Kontrollgruppe vergleichbarer kontinuierlicher Anstieg der T-Zellen im peripheren Blut ($3,9 \pm 1,7$ % Tag 21; $14,2 \pm 6,6$ % Tag 49). Wie in der Kontrollgruppe handelte es sich hierbei hauptsächlich um aus dem Transplantat gereifte CD4⁺ T-Zellen ($1,7 \pm 0,09$ % Tag 21; $10 \pm 3,6$ % Tag 49), aber auch KM-stämmige CD8⁺ Spender-T-Zellen stiegen über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich an ($1,1 \pm 1,4$ % Tag 21; $3,1 \pm 2,4$ % Tag 49). Darüber hinaus konnten bis Tag 49 noch residuelle CD4⁺ Empfänger-T-Zellen detektiert werden ($0,6 \pm 0,8$ %). Der prozentuale Anteil der an Tag 21 nachträglich transplantierten 1×10^6 Tconv-Zellen nahm bis Tag 49 kontinuierlich ab ($0,9 \pm 0,2$ % Tag 28; $0,4 \pm 0,2$ % Tag 49).

Deutliche Unterschiede gegenüber den beiden anderen Gruppen (keine Tconv; 1×10^6 Tconv) fielen in der Gruppe auf, die 8×10^6 Tconv Zellen erhielt. Hier zeigte sich ebenfalls zwischen Tag 21 und Tag 28 ein rascher Anstieg der T-Zellen von $3 \pm 0,8$ % auf 12 ± 4 %, danach fielen die T-Zell-Zahlen bis Tag 49 wieder kontinuierlich ab ($6,5 \pm 5$ % Tag 42; $4,3 \pm 3,1$ % Tag 49). Es handelte sich hierbei hauptsächlich um die an Tag 21 transplantierten Tconv-Zellen ($5,2 \pm 1,5$ % Tag 28; $0,9 \pm 0,2$ % Tag 49). Bis Tag 21, vor Gabe der Tconv-Zellen, konnten in der Gruppe lediglich $1,2 \pm 0,4$ % CD4⁺ T-Zellen und $0,3 \pm 0,2$ % CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden, die aus dem Transplantat entstanden waren. Bis Tag 28 stieg deren Anteil noch leicht an ($3 \pm 1,9$ % CD4⁺; $1,9 \pm 2,9$ % CD8⁺) und blieb danach bis Tag 49 weitgehend konstant ($2,5 \pm 1,4$ % CD4⁺; $1,8 \pm 0,7$ % CD8⁺). Die an Tag 21 noch vorhandenen Empfänger T-Zellen ($1,4 \pm 0,6$ % CD4⁺; $0,1 \pm 0,1$ % CD8⁺) konnten an Tag 49 im Gegensatz zur Kontrollgruppe und der 1×10^6 Tconv Gruppe im peripheren Blut nicht mehr detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in der Gruppe, die 12×10^6 Tconv Zellen erhalten hatte. Auch hier kam es zwischen Tag 21 und Tag 28 zu einem Anstieg der T-Zellen ($4,1 \pm 0,9$ % Tag 21; $8,3 \pm 1,6$ % Tag 28) und anschließend wieder zum Abfall der Spender-T-Zellen bis Tag 49 ($4,3 \pm 2,3$ %). Auch in dieser Gruppe wurde der

Anstieg durch die an Tag 21 transferierten Tconv-Zellen verursacht. Ihr Anteil lag an Tag 28 bei $4,55 \pm 2 \%$ und nahm bis Tag 49 wieder auf $0,4 \pm 0,2 \%$ ab.

Die an Tag 21 bereits rekonstituierten $1,7 \pm 0,7 \%$ CD4⁺ T-Zellen zeigten über den ganzen Beobachtungszeitraum keine weitere Veränderung mehr. Hingegen konnte bei den aus dem Transplantat gereiften CD8⁺ T-Zellen noch bis Tag 28 eine Zunahme detektiert werden ($0,7 \pm 0,1 \%$ Tag 21; $3,1 \pm 1,6 \%$ Tag 28), der prozentuale Anteil blieb anschließend jedoch konstant.

Nach Abschluss des Experiments (Tag 50) wurde die leukozytäre Zusammensetzung von Knochenmark und Milz in den einzelnen Gruppen bestimmt. Als Vergleichswert dienten Milz- und Knochenmark aus unbehandelten C57BL/6 Mäusen.

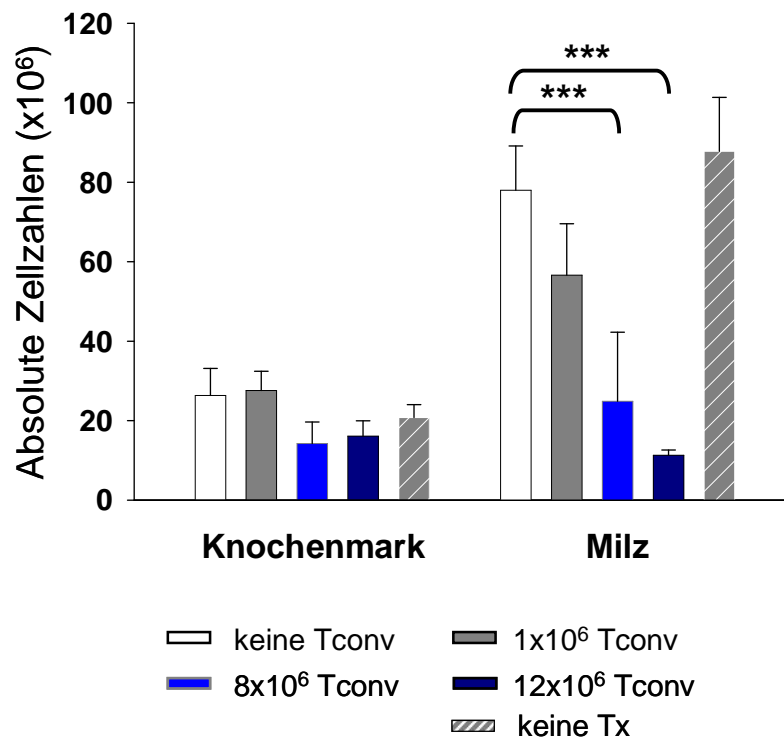


Abb. 3.24: Gesamtzellzahl des KM und der Milz allogenen transplantierte Empfängertiere nach zeitverzögerter GVHD Induktion.

Organentnahme und durchflusszytometrische Analyse erfolgte an Tag 50 nach Transplantation. Die Balken zeigen Mittelwerte von $n = 3-5$ Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Zellzahlen beziehen sich auf die gesamte Milz bzw. Femur und Tibia der beiden Hinterläufe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) und die Sternchen kennzeichnen die Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, one-way ANOVA mit anschließendem post-hoc-Test nach Dunnet).

Die absolute Zellzahl im Knochenmark (**Abb. 3.24, links**) lag bei den Mäusen der Kontrollgruppe (keine Tconv) mit $26,3 \pm 6,8 \times 10^6$ Zellen und in der Gruppe 1×10^6 Tconv mit $27,6 \pm 4,8 \times 10^6$ Zellen leicht über dem Normalbereich von unbehandelten C57BL/6 Tieren ($21 \pm 3,3 \times 10^6$ Zellen). Die Gruppen 8×10^6 Tconv oder 12×10^6 Tconv-Zellen zeigten eine

gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant verminderte Gesamtzellzahl im KM (8×10^6 Tconv: $14,2 \pm 5,4 \times 10^6$ Zellen; 12×10^6 Tconv: $16,1 \pm 3,9 \times 10^6$ Zellen). Dagegen ergab die Analyse der Gesamtmilzzellzahlen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen experimentellen Gruppen (**Abb. 3.24, rechts**). Die Kontrollgruppe (keine Tconv) zeigte an Tag 50 nach Transplantation in der Milz eine Anzahl von $78 \pm 11 \times 10^6$ Zellen, die der von unbehandelten Mäusen entsprach ($87 \pm 13,6 \times 10^6$ Zellen). In der Gruppe mit 1×10^6 Tconv wurde eine leicht verringerte Anzahl an Milzzellen detektiert ($56 \pm 12,9 \times 10^6$ Zellen), wobei die Unterschiede statistisch nicht signifikant waren. In den beiden anderen Gruppen (8×10^6 Tconv bzw. 12×10^6 Tconv) waren die Gesamtzellzahlen in der Milz gegenüber der Kontrolle jedoch signifikant verringert (8×10^6 Tconv: $24,9 \pm 17,4 \times 10^6$; 12×10^6 Tconv: $11,3 \pm 1,3 \times 10^6$).

In der zellspezifischen Zusammensetzung des Knochenmarks (**Abb. 3.25 A**) konnte man sowohl bei den Granulozyten- als auch bei den Monozytenzellzahlen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der experimentellen Gruppen feststellen. Vergleicht man diese jedoch mit unbehandelten C57BL/6 Tieren, so waren die Granulozytenzellzahlen aller experimenteller Gruppen leicht verringert, während die Monozytenzellzahlen im Vergleich dazu etwas erhöhte Werte zeigten.

Zwischen den Gruppen konnte aber ein deutlicher Unterschied in den B-Zellzahlen im KM gezeigt werden. Tiere der Kontrollgruppe oder der Gruppe 1×10^6 Tconv zeigten ähnliche B-Zellzahlen (keine Tconv: $5,9 \pm 2,1 \times 10^6$; 1×10^6 Tconv: $7,1 \pm 2,5 \times 10^6$), die im Vergleich zu unbehandelten Tieren etwas erniedrigt waren. Hingegen zeigte die Analyse der B-Zellen in den Gruppen 8×10^6 Tconv oder 12×10^6 Tconv im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verringerte Zellzahl (8×10^6 Tconv: $1,7 \pm 2,5 \times 10^6$; 12×10^6 Tconv: $1,3 \pm 1,5 \times 10^6$). Bei den T-Zellzahlen im KM konnten zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Analysiert man die T-Zellen der einzelnen Gruppen nochmals getrennt nach CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, so konnten zwischen den experimenteller Gruppen keine Unterschiede detektiert werden. Die T-Zellzahlen und auch die Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen waren jedoch gegenüber unbehandelten Tieren in allen Gruppen signifikant verringert.

Bei der zellulären Zusammensetzung der Milz (**Abb. 3.25 B**) zeigten sich hinsichtlich der Granulozyten- und Monozytenzellzahl keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen experimentellen Gruppen. Die Granulozytenzahlen waren im Vergleich zu unbehandelten Tieren leicht erhöht. Dagegen konnten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bei den B-Lymphozyten festgestellt werden. Sowohl die Kontrollgruppe (keine Tconv) also auch die Gruppe mit 1×10^6 Tconv zeigten ähnliche B-Zellzahlen in der Milz (keine Tconv: $34,7 \pm 3,1 \times 10^6$; 1×10^6 Tconv: $27,4 \pm 7,4 \times 10^6$), die gegenüber unbehandelten Tieren signifikant verringert waren. Tiere, die 8×10^6 oder 12×10^6 Tconv

Zellen erhalten hatten, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe (keine Tconv) eine signifikant verringerte B-Zellzahl in der Milz (8×10^6 Tconv: $7,2 \pm 11,9 \times 10^6$; 12×10^6 Tconv: $2,1 \pm 1,7 \times 10^6$). Bei den T-Zellzahlen zeigten sowohl die Kontrollgruppe und die Gruppe 1×10^6 ähnliche Werte (keine Tconv: $16,5 \pm 5 \times 10^6$; 1×10^6 Tconv: $11,7 \pm 4,5 \times 10^6$).

A)

B)

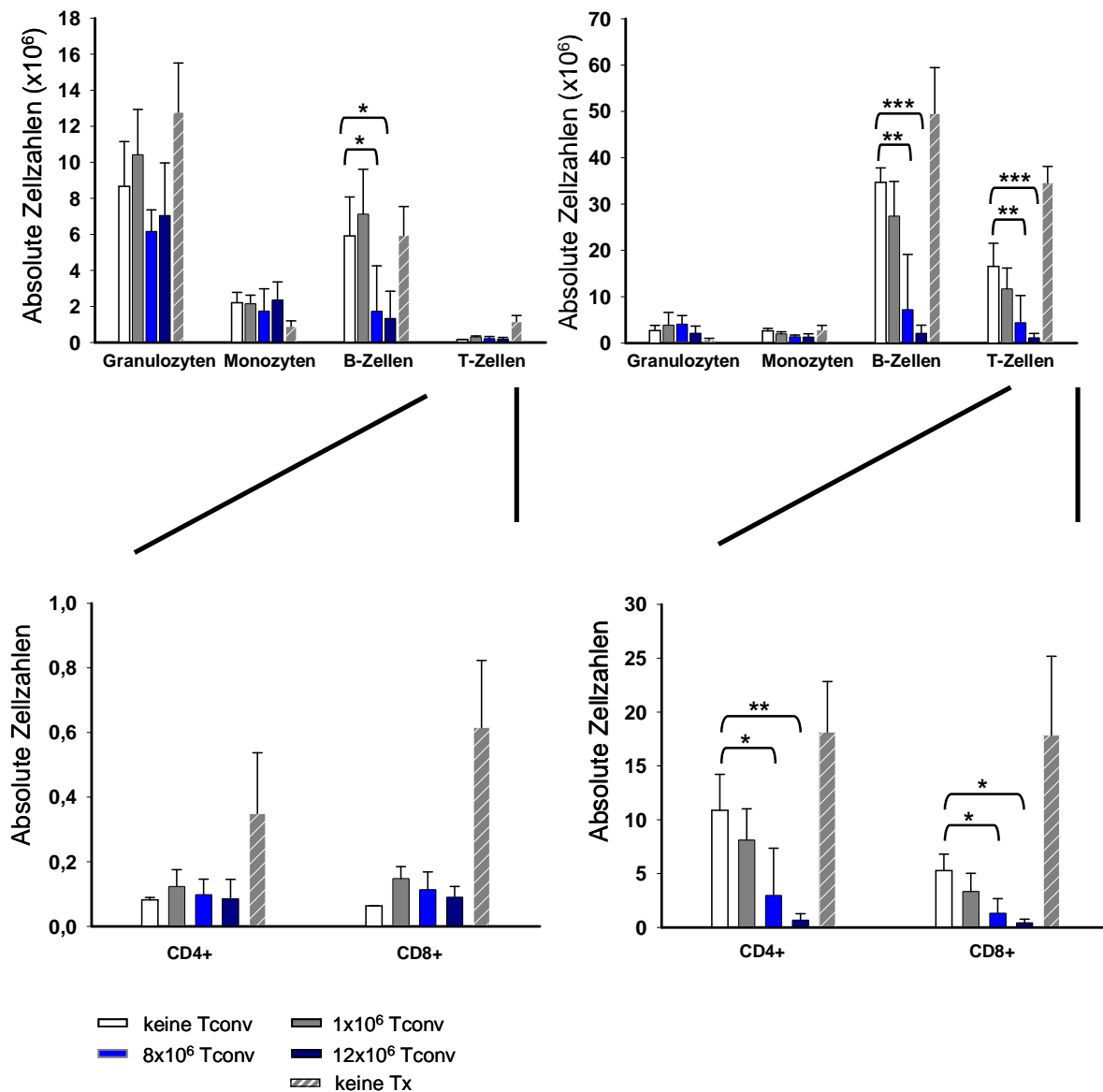


Abb. 3.25: Leukozytäre Zusammensetzung reisolierter Milz- und Knochenmarkszellen allogren transplantierte Empfängertiere nach zeitverzögerter GVHD Induktion.

Organentnahme und durchflusszytometrische Analyse der zellulären Zusammensetzung von KM (A) und Milz (B) erfolgte an Tag 50 nach Transplantation. Als Vergleichswert dienten KM und Milz von unbehandelten C57BL/6 Mäusen. Die Balken zeigen Mittelwerte von $n=3-5$ Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Zellzahlen beziehen sich auf die gesamte Milz bzw. Femur und Tibia der beiden Hinterläufe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) und die Sternchen kennzeichnen die Signifikanz (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$, one-way ANOVA mit anschließendem post-hoc-Test nach Dunnett).

Die getrennte Analyse der T-Zellen nach CD4⁺- (keine Tconv: $10,9 \pm 3,3 \times 10^6$; 1×10^6 Tconv: $8,1 \pm 2,9 \times 10^6$) und CD8⁺- (keine Tconv: $5,2 \pm 1,5 \times 10^6$; 1×10^6 Tconv: $3,3 \pm 1,7 \times 10^6$) T-Zellen zeigten ebenfalls keine Unterschiede in den beiden Gruppen. Im Vergleich zu den in der Milz von naiven C57BL/6 Mäusen detektierten T-Zellzahlen waren sie jedoch signifikant verringert. In den Gruppen 8×10^6 oder 12×10^6 Tconv wurden sowohl im Vergleich zu der Gruppe mit 1×10^6 Tconv als auch gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringerte T-Zellzahlen in der Milz detektiert (8×10^6 Tconv: $4,4 \pm 5,8 \times 10^6$; 12×10^6 Tconv: $1,1 \pm 0,9 \times 10^6$). Die signifikante Verringerung der T-Zellen galt sowohl für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass eine zeitverzögerte DLI in Form von 8×10^6 oder 12×10^6 Tconv-Zellen an Tag 21 in allogenen transplantierten Empfängertieren eine GVHD induzierte, die zu einem Verlust bereits rekonstituierter B-Zellen führte. Zusätzlich zeigte sich durch die DLI auch ein Effekt auf die T-Zell-Rekonstitution. Hierbei kam es nach der Tconv-Gabe zwar zu keinem Rückgang bereits rekonstituierter T-Zellen, die weitere Rekonstitution des T-Zell-Kompartiments wurde allerdings gestört.

3.4 Effekte der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF auf die B-Zell-Rekonstitution nach allogener KMT

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die im Rahmen des sogenannten „Zytokinsturms“ freigesetzten pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF für die fehlende B-Zell-Rekonstitution bei GVHD verantwortlich sind. Beide Zytokine werden von alloreaktiven T-Zellen sezerniert und von beiden wurde beschrieben, dass sie die B-Zell-Entwicklung im KM direkt oder indirekt z.B. über ihre Wirkung auf Makrophagen und Stromazellen, beeinträchtigen können (193-198). Methodisch wurde für diese Untersuchungen ein kompetitives KM-Transplantationssystem eingesetzt. Dabei wurden KM-Zellen aus Wildtyp- und IFN- γ R-defizienten bzw. TNFR1/2-defizienten Tieren im Verhältnis 1:1 gemischt und in letal bestrahlte Empfängertiere übertragen. Durch Ko-Transplantation von peripheren T-Zellen wurde eine GVHD induziert und anschließend untersucht, ob B-Zellen trotz GVHD aus Zytokinrezeptor-negativen Knochenmarkzellen rekonstituieren. Als Kontrollen dienten Transplantatempfänger, in denen keine GVHD induziert wurde und von denen erwartet wurde, dass die B-Zell-Rekonstitution zu gleichen Teilen aus Wildtyp und Rezeptor-defizienten KM-Zellen stattfindet. Die jeweilige Zusammensetzung des TZD KM und das Transplantationsschema sind in **Abb. 3.26** dargestellt.

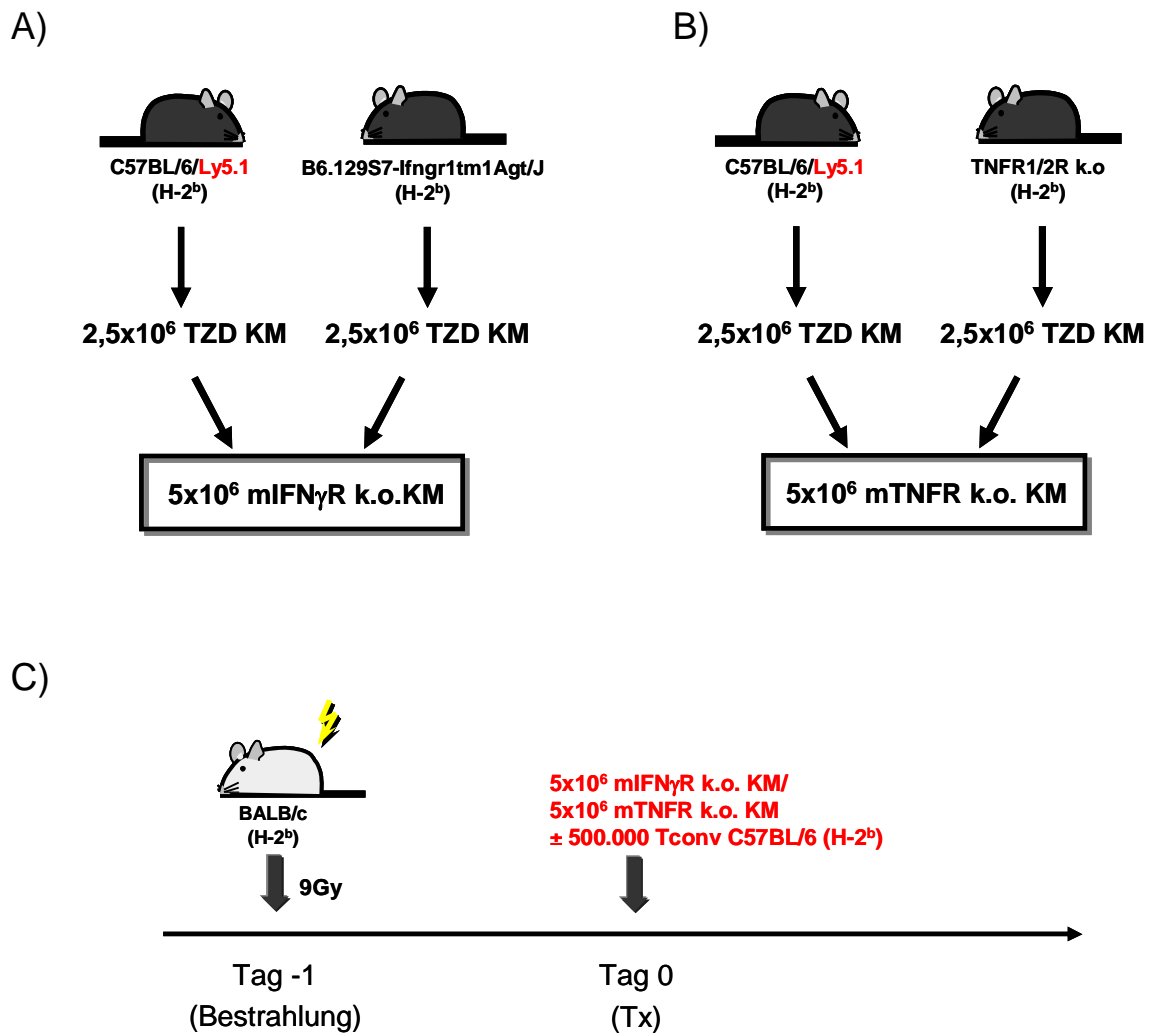


Abb. 3.26: Zusammensetzung des transplantierten Knochenmarks und Transplantations-schema.

Zur Herstellung der gemischten KM-Transplantate wurden KM-Zellen aus C57BL/6/Ly5.1 Mäusen und IFN- γ R k.o. Mäusen oder TNFR1/2 k.o. Mäusen isoliert, T-Zell-depletiert und jeweils 1:1 gemischt (s. A und B). Anschließend wurden die Zellen entweder alleine oder zusammen mit $0,5 \times 10^6$ Tconv-Zellen aus C57BL/6 (Ly5.2) wt Mäusen in letal bestrahlte BALB/c Empfängertiere transplantiert. Die verwendeten k.o. Tiere waren alle auf einem C57BL/6 (Ly5.2) Hintergrund generiert (C).

Zur Überwachung der GVHD unter den veränderten Versuchsbedingungen wurde das Gewicht und regelmäßig der klinische GVHD-Score ermittelt. Die Tiere der jeweiligen KM-Gruppe zeigten den erwarteten Verlauf (**s. Abb. 3.27 A und B**), nämlich einen bestrahlungsbedingten frühen Gewichtsverlust mit anschließend rascher Normalisierung und stetiger Gewichtszunahme ab Tag 7 nach Transplantation. Auch die beiden GVHD-Gruppen (mIFN γ R k.o. KM + Tconv und mTNFR1/2 k.o. KM + Tconv) entwickelten sich erwartungsgemäß. Nach dem bestrahlungsbedingten Gewichtsabfall kam es zu einer kurzfristigen Erholung bis Tag 15, danach kam es zu einem kontinuierlichen Gewichtsverlust und einem rapiden Anstieg des GVHD-Scores. Während 91 % der mIFN γ R k.o. KM Gruppe und 80 % der mTNFR1/2 k.o. KM Gruppe den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen

überlebten, verstarben alle Versuchstiere der GVHD-Gruppen (mIFN γ R k.o. KM + Tconv und mTNFR1/2 k.o. KM + Tconv) innerhalb von 32 bzw. 97 Tagen nach Transplantation an den Folgen der GVHD (**Abb. 3.27 C**).

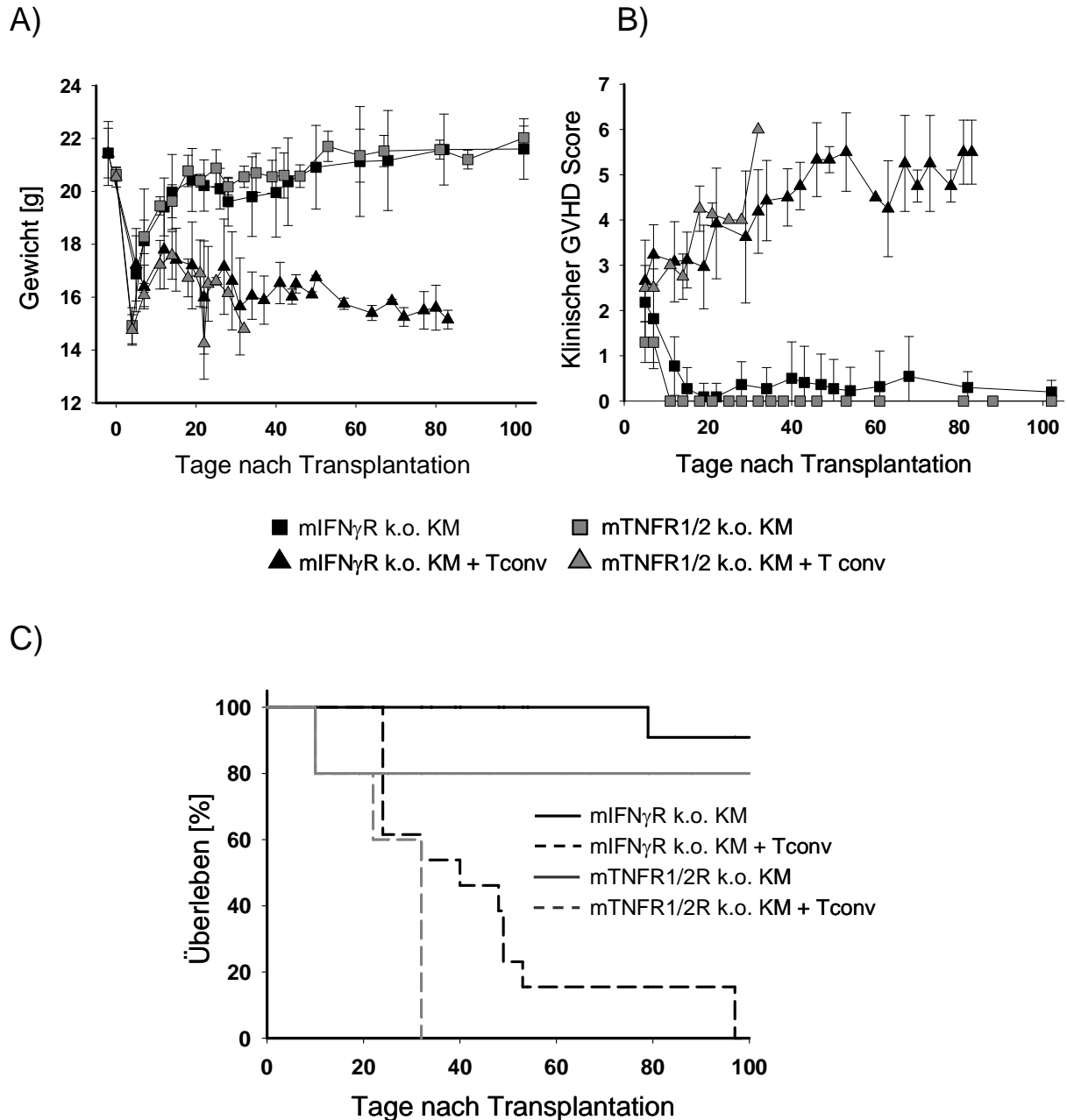


Abb. 3.27 Gewicht, klinischer GVHD Score und Überleben von BALB/c Mäusen nach allogener Transplantation mit gemischtem Knochenmark.

BALB/c Tiere wurden mit 9Gy letal bestrahlt und mit mIFN γ R k.o. KM (■; n= 11) oder mTNFR1/2 k.o. KM (■; n= 5) alleine oder zusammen mit C57BL/6 Tconv-Zellen (mIFN γ R k.o. KM + Tconv; ▲; n= 13 oder mTNFR k.o. KM + Tconv; ▲; n= 5) allogene transplantiert. Dargestellt sind der Gewichtsverlauf (A), der klinische GVHD Score (B) und das Überleben (C). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

3.4.1 Verlauf der B-Zell-Rekonstitution im kompetitiven KMT-Modell

Zur Untersuchung der B-Zell-Rekonstitution in den Empfängertieren wurde der Anteil der B-Zellen unter den MNZ im peripheren Blut 3 und 5 Wochen nach Transplantation durchflusszytometrisch bestimmt.

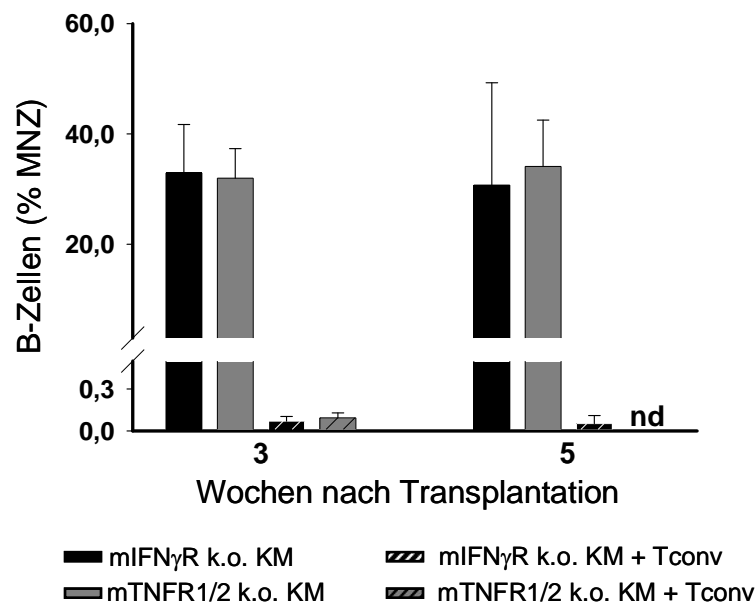


Abb. 3.28: Prozentualer Anteil CD19⁺ B-Zellen im peripheren Blut nach allogener Transplantation mit gemischtem KM.

Für die Untersuchung der B-Zell-Rekonstitution im peripheren Blut wurden in einem ersten Ansatz Empfängermäuse analysiert, denen entweder nur mIFN γ R k.o. KM ($n=6$) oder mTNFR1/2 k.o. KM ($n=5$) alleine oder zusammen mit C57BL/6 wt Tconv-Zellen (mIFN γ R k.o. KM + Tconv; $n=7$ und mTNFR1/2R k.o. KM + Tconv; $n=5$) transplantiert wurden. Die durchflusszytometrische Detektion der B-Zellen unter den MNZ erfolgte 3 bzw. 5 Wochen nach Transplantation. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

Wie in **Abb. 3.28** dargestellt, war in Tieren beider KM-Gruppen nach 3 Wochen eine B-Zell-Rekonstitution mit $33 \pm 8,8$ % (mIFN γ R k.o. KM) und $32 \pm 5,3$ % (mTNFRk.o. KM) nachweisbar, obwohl diese im Vergleich zu nicht transplantierten naiven C57BL/6 (57 ± 10 % B-Zellen) noch vermindert war. Dasselbe Bild zeigte sich auch 5 Wochen nach Transplantation (30 ± 18 % in der mIFN γ R k.o. KM- Gruppe und $34 \pm 8,4$ % in der mTNFR1/2 k.o. KM- Gruppe). Im Gegensatz dazu ließen sich kaum B-Zellen im peripheren Blut von GVHD-Tieren nach 3 Wochen nachweisen ($0,07 \pm 0,03$ % in der mIFN γ R k.o. KM + Tconv-Gruppe und $0,09 \pm 0,04$ % in der mTNFR1/2 k.o. KM + Tconv-Gruppe) und sie rekonstituierten nicht weiter bis Woche 5 in der mTNFR1/2 k.o. KM + Tconv Gruppe (mTNFR1/2 k.o. + Tconv Tiere zu diesem Zeitpunkt bereits alle verstorben).

Bei den im peripheren Blut der Empfängermäuse detektierten B-Zellen handelte es sich ausnahmslos um rekonstituierte Spender B-Zellen. Um den prozentualen Beitrag der beiden

unterschiedlichen KM-Bestandteile (wt versus k.o.) zu ermitteln, wurde die Expression der spenderspezifischen Antigene H-2k^b und CD45.1 auf den B-Zellen bestimmt. Dies konnte wegen des äußerst geringen B-Zellanteils in den Tieren mit GVHD nur mit den Tieren der KM-Gruppen durchgeführt werden.

Wie in **Abb. 3.29** zu sehen, stammen nach drei Wochen von den $35 \pm 7 \%$ B-Zellen in Tieren die wt und IFN γ R k.o. KM erhalten hatten $25 \pm 5 \%$ aus dem IFN γ R k.o. KM (relativer Anteil 71 %) und $10 \pm 2 \%$ aus dem C57BL/6 Ly5.1 KM (relativer Anteil 29 %). Diese Verteilung blieb auch nach 5 Wochen konstant.

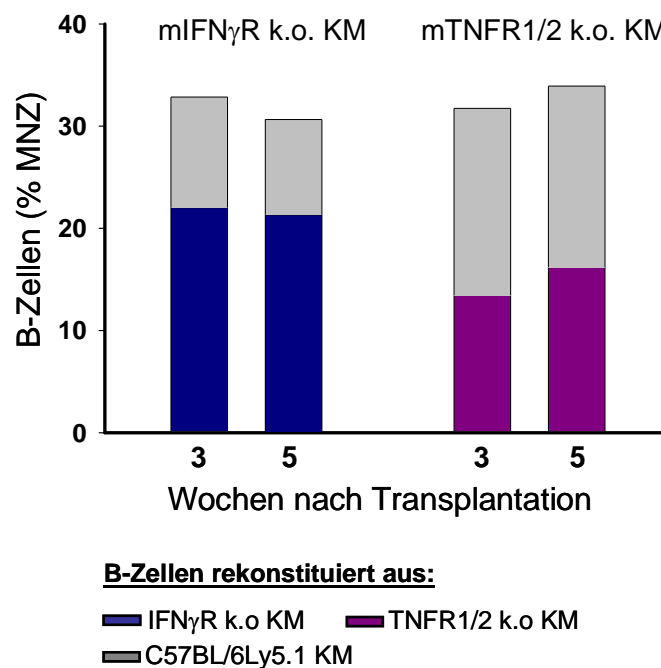


Abb. 3.29: Abstammung der rekonstituierten CD19⁺ B-Zellen im peripheren Blut der Kontrollgruppe nach allogener Transplantation von gemischtem wt und Zytokinrezeptor-defizientem KM.

BALB/c Empfängertiere wurden mit 9Gy letal bestrahlt und mit mIFN γ R k.o. KM (n= 6) oder mTNFR1/2 k.o. KM (n= 5) allogen transplantiert. Mittels durchflusszyometrischer Analysen von peripherem Blut erfolgte in Woche 3 und Woche 5 nach Transplantation die Differenzierung der rekonstituierten B-Zellen bezüglich ihrer Abstammung.

Nach Transplantation von gemischtem wt und TNFR k.o. KM stammten die rekonstituierten B-Zellen ($32 \pm 5,4 \%$) 3 Wochen nach Transplantation zu $13,4 \pm 2 \%$ vom TNFR1/2 k.o. KM ab und zu $18,3 \pm 3,7 \%$ aus dem C57BL/6 Ly5.1 wt KM. Auch dieses Verhältnis (ca. 50:50) blieb bis Woche 5 nach Transplantation erhalten.

3.4.2 FACS- Analysen von Milz und Knochenmark der Empfänger-tiere nach Transfer des gemischten KM

Die Zusammensetzung des rekonstituierten B-Zell-Kompartiments in den Empfängertieren wurde nicht nur im peripheren Blut, sondern auch im KM und in der Milz bestimmt. Bei Tieren, die im Versuchsverlauf starben, erfolgte die Analyse soweit möglich am Tag ihres Versterbens. Alle übrigen Tiere wurden nach Ablauf des Beobachtungszeitraums von 100 Tagen analysiert.

Die Tiere beider Gruppen zeigten mit einer durchschnittlichen Gesamtzellzahl von $30,6 \pm 14,2 \times 10^6$ (mIFN γ R k.o. KM) und $25,9 \pm 11,3 \times 10^6$ (mTNFR k.o. KM) Zellen eine normale Zellularität im KM. Im Gegensatz dazu war die KM-Zellularität in den beiden GVHD-Gruppen mit $23,7 \pm 11,2 \times 10^6$ (mIFN γ R k.o. KM + Tconv) und $10,6 \pm 4 \times 10^6$ (mTNFR k.o. + Tconv) Zellen jeweils deutlich, jedoch statistisch nicht signifikant erniedrigt. Vor allem bei den mTNFR k.o. KM + Tconv Empfängertieren ist dies teilweise auf den früheren Analysezeitpunkt (< Tag 30) nach GVHD-Induktion zurückzuführen (**Abb. 3.30, links**). Wesentlich deutlicher fielen die Unterschiede zwischen den Tieren mit und ohne GVHD bei der Gesamtmilzzellzahl aus (**Abb. 3.30, rechts**).

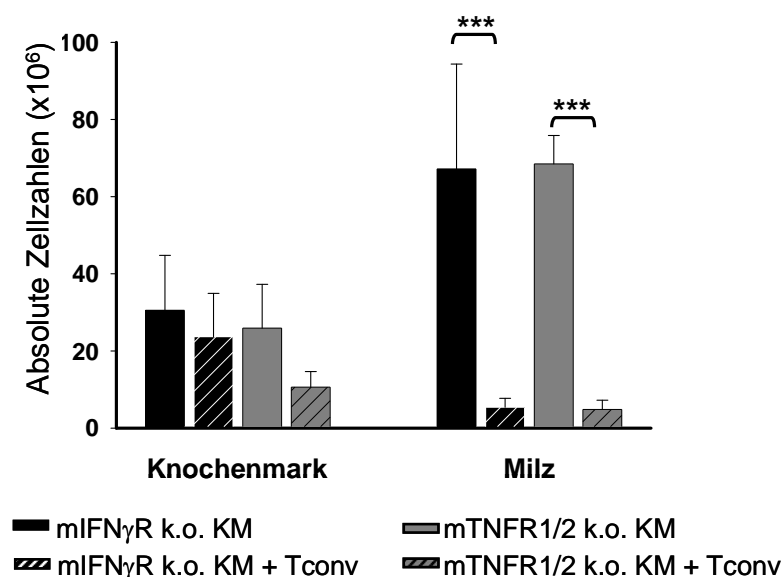


Abb. 3.30 Gesamtzellzahl reisolierter Leukozyten aus KM und Milz.

Nach allogener Transplantation von gemischtem KM \pm Tconv-Zellen wurden KM und Milz der einzelnen Gruppen durchflusszytometrisch analysiert. Die Tiere mit mIFN γ R k.o.- und mTNFR k.o. KM wurden an Tag 100 analysiert, die restlichen Tiere am Tag des Versterbens. Die Balken stellen einen Mittelwerte von 4-12 Mäusen/Gruppe aus je zwei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Die Zellzahlen beziehen sich auf die gesamte Milz oder Femur und Tibia der beiden Hinterläufe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) und die Sternchen kennzeichnen die Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, zweiseitiger Student's T-Test).

Ähnlich wie im Knochenmark konnte in beiden Kontrollgruppen eine annähernd gleiche Splenozytenzellzahl detektiert werden. Die Gruppe die mIFN γ R k.o. KM erhalten hatte enthielt in der Milz $67,2 \pm 27,2 \times 10^6$ Zellen und die Gruppe die mTNFR1/2 k.o. KM erhalten hatte $68,5 \pm 7,3 \times 10^6$ Gesamtmilzzellen. Im Unterschied hierzu wurden in den Empfängermausen mit GVHD nach Tconv-Zell-Transfusion gegenüber den KM-Kontrollgruppen signifikant verringerte Gesamtmilzzellzahl festgestellt (mIFN γ R k.o. KM + Tconv: $5,42 \pm 2,3 \times 10^6$ Zellen und mTNFR1/2 k.o. KM + Tconv: $4,84 \pm 2,4 \times 10^6$ Zellen). Zusätzlich zu den Gesamtzellzahlen wurde auch die leukozytäre Zusammensetzung von KM und Milz bestimmt. Bezüglich der Granulozyten- und Monozytenzahlen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden und die detektierten Zellzahlen entsprachen in etwa denen von unbehandelten C57BL/6 Tieren (**Abb. 3.31 A**). Deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen konnten hingegen in den B-Zellzahlen im KM gezeigt werden. Die Tiere der beiden Kontrollgruppen zeigten vergleichbare B-Zellzahlen im KM (mIFN γ R k.o. KM: $5,15 \pm 3,1 \times 10^6$ Zellen; mTNFR1/2 k.o. KM: $3,3 \pm 2,4 \times 10^6$ Zellen), die denen von unbehandelten Tieren entsprachen. Auch im KM entstammten die rekonstituierten B-Zellen nach Transplantation von mIFN γ R k.o. KM zu 75 % aus dem k.o. KM und nur zu 25 % aus dem wt KM. Die rekonstituierten B-Zellen in Mäusen die mTNFR1/2 k.o. KM erhalten hatten, stammten zu gleichen Teilen aus k.o. und wt KM. Hingegen fehlten die B-Zellen vollständig im KM der jeweiligen GVHD-Gruppen (mIFN γ R k.o. KM + Tconv; mTNFR k.o. KM + Tconv).

Bei den T-Zellzahlen im KM konnten zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. In allen Gruppen war ihre Anzahl im Vergleich zu unbehandelten Tieren etwas erniedrigt.

Bei der zellulären Zusammensetzung in der Milz (**Abb. 3.31 B**) zeigten sich hinsichtlich der Granulozytenzellzahl keine signifikanten Unterschiede zu den experimentellen Gruppen. Die Granulozytenzahlen waren im Vergleich zu unbehandelten Tieren leicht erhöht. Während Tiere, die nur Knochenmark erhalten hatten, eine vergleichbare Anzahl an Monozyten in der Milz zeigten (IFN γ R k.o. KM: $1,9 \pm 1,7 \times 10^6$ Zellen; TNFR1/2 k.o. KM: $1,6 \pm 0,9 \times 10^6$ Zellen), die derjenigen von unbehandelten Tieren entsprach, war die Monozytenzahl in den GVHD Gruppen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen und unbehandelten Mäusen signifikant verringert (IFN γ R k.o. KM + Tconv: $0,5 \pm 0,54 \times 10^6$ Zellen; TNFR1/2 k.o. KM: $0,15 \pm 0,1 \times 10^6$ Zellen).

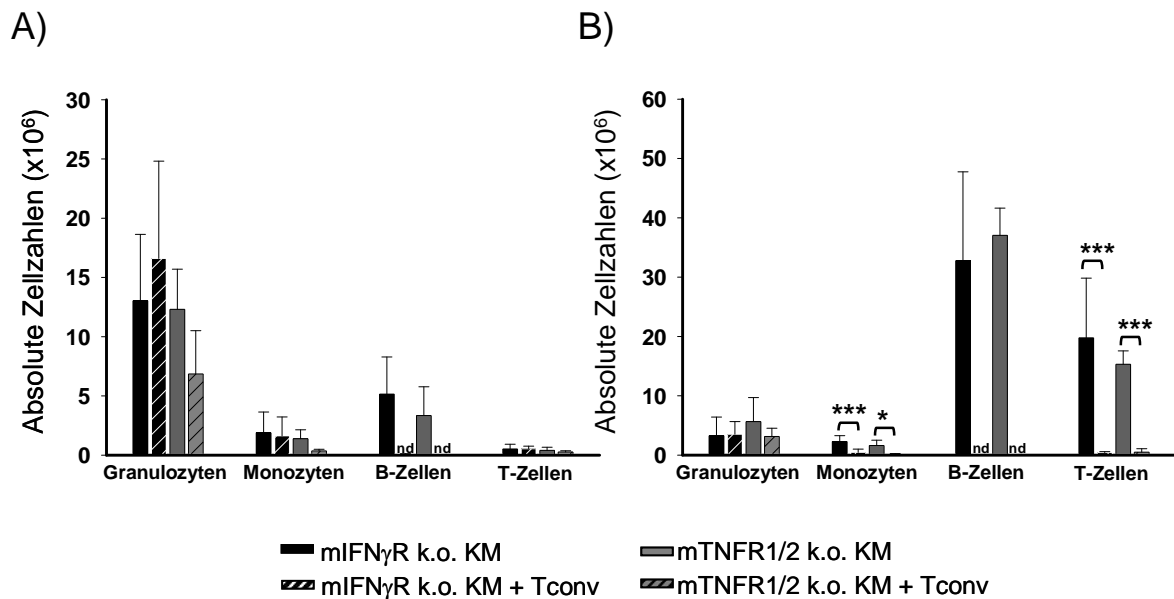


Abb. 3.31 Leukozytäre Zusammensetzung reisolierter Milz- und Knochenmarkzellen nach allogener Transplantation mit gemischtem KM.

Nach allogener Transplantation von gemischtem KM mit und ohne Tconv-Zellen wurden KM (A) und Milz (B) durchflusszytometrisch analysiert. Tiere der mIFN γ R k.o. und mTNFR k.o. KM-Gruppen wurden an Tag 100 analysiert, die restlichen Tiere am Tag des Versterbens. Die Balken stellen einen Mittelwerte von 4-12 Mäusen/Gruppe aus je zwei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Die Zellzahlen beziehen sich auf die gesamte Milz oder Femur und Tibia beider Hinterläufe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) und die Sternchen kennzeichnen die Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, zweiseitiger Student's T-Test).

Bei den B-Zellen zeigten die zwei Kontrollgruppen eine vergleichbare und im Normalbereich liegende Anzahl in der Milz (IFN γ R k.o. KM: $32,7 \pm 14,9 \times 10^6$ Zellen; TNFR1/2 k.o. KM: $37 \pm 4,5 \times 10^6$ Zellen). Die rekonstituierten B-Zellen in Mäusen der IFN γ R k.o. KM-Gruppe stammten in der Milz zu 76 % vom k.o.- und zu 24 % vom wt KM ab, während in der TNFR1/2 k.o. KM-Gruppe die Rekonstitution zu gleichen Teilen aus beiden Knochenmarkern erfolgt war.

In den GVHD Tieren fehlten in Analogie zum Knochenmark die B-Zellen auch in der Milz vollständig. Bei den T-Zellzahlen zeigten die Kontrollgruppen ebenfalls ähnliche Werte (mIFN γ R k.o. KM: $19,8 \pm 10 \times 10^6$ Zellen; mTNFR1/2 k.o. KM: $15,3 \pm 2,2 \times 10^6$ Zellen), die im Vergleich zu unbehandelten Tieren um ca. 50 % erniedrigt waren, während sich bei den an GVHD erkrankten Mäusen ein signifikant verringerter Anteil an T-Zellen in der Milz zeigte (mIFN γ R k.o. KM: $0,42 \pm 0,15 \times 10^6$ Zellen; TNFR1/2 k.o. KM: $0,5 \pm 0,6 \times 10^6$ Zellen).

Zusammengefasst machen die hier gezeigten Daten deutlich, dass weder IFN- γ noch TNF alleine, zur direkten Störung von B-Vorläuferzellen im KM bei GVHD führen, da die B-Zell-Rekonstitution selbst bei Verwendung von IFN γ R- oder TNFR- defizienten Stammzellen inhibiert wird.

3.5 Untersuchungen zum B-Zell-Rekonstitutionspotential von KM aus GVHD-Tieren

3.5.1 Bestimmung des Rekonstitutionspotentials *in vitro*

Im Knochenmark findet die Reifung der B-Zellen aus den lymphoiden Vorläuferzellen (common lymphoid progenitors, CLP) statt. CLP benötigen hierfür Kontakt mit Stromazellen und den Wachstums- und Überlebensfaktor IL-7, der unter anderem von den KM-Stromazellen produziert wird.

Die B-Zellentwicklung aus CLP bis hin zu reifen B-Zellen kann in einem *in vitro* Kultursystem nachvollzogen werden. Hierfür wird aufgereinigtes KM für ca. 7 Tage in Gegenwart von IL-7 auf einen semikonfluenten Rasen aus bestrahlten murinen Stromazellen (Zelllinie ST-2) inkubiert und anschließend werden die aus den CLP hervorgegangenen B-Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen. Im Folgenden wurde dieses Kultursystem eingesetzt um zu klären, ob das KM von Tieren mit GVHD bereits ein Defizit an CLP aufweist oder ob bei normaler CLP-Anzahl lediglich die Entwicklung zur reifen B-Zelle unter den im Rahmen der GVHD veränderten Mikromilieubedingungen im Knochenmark inhibiert ist. Während im ersten Fall auch im *in vitro* Kultursystem eine stark verminderte oder ganz ausbleibende B-Zellreifung auftreten sollte, wäre im zweiten Fall eine normale Anzahl von B-Zellen nach *in vitro* Kulturphase zu erwarten.

3.5.1.1 Etablierung des *in vitro* Kultursystems mit ST-2 Stromazellen

Für die Etablierung des Kultursystems wurde KM aus C57BL/6 Tieren verwendet, aus dem zuvor mittels MACS alle CD19⁺ und CD90⁺ Zellen (B- und T-Zellen) entfernt wurden (TZD/BZD KM). Die B-Zell-Entwicklung wurde nach 7 Tagen sowohl mikroskopisch als auch durchflusszytometrisch bestimmt (**Abb. 3.32 A**). Dabei zeigte sich, dass in einem Bereich von 100-400 KM-Zellen/Vertiefung einer 96-Loch-Platte mit zunehmender Anzahl an eingesetzten Knochenmarkzellen der prozentuale und absolute Anteil an B-Zellen nach Ablauf der Kultur anstieg. Wurden mehr als 800 Zellen/Vertiefung eingesetzt, so ging der Anteil an B-Zellen stark zurück. Daher wurden für alle weiteren Versuche 200 oder 400 KM-Zellen/Vertiefung eingesetzt. Für die Testetablierung wurde T- und B-Zell depletiertes Knochenmark verwendet. Zur Untersuchung der KM-Funktion von GVHD Tieren wurde sowohl Gesamtknochenmark als auch TZD/BZD KM in das *in vitro* Kultursystem eingesetzt. Vergleicht man die beiden Ansätze (**Abb. 2.32 B**) anhand der im FACS detektierten prozentualen Anteile an CD19⁺ B-Zellen, so konnten keine Unterschiede festgestellt werden. In allen weiteren Versuchen wurde deshalb kein TZD/BZD KM, sondern nur Gesamtknochenmark in den Assay eingesetzt.

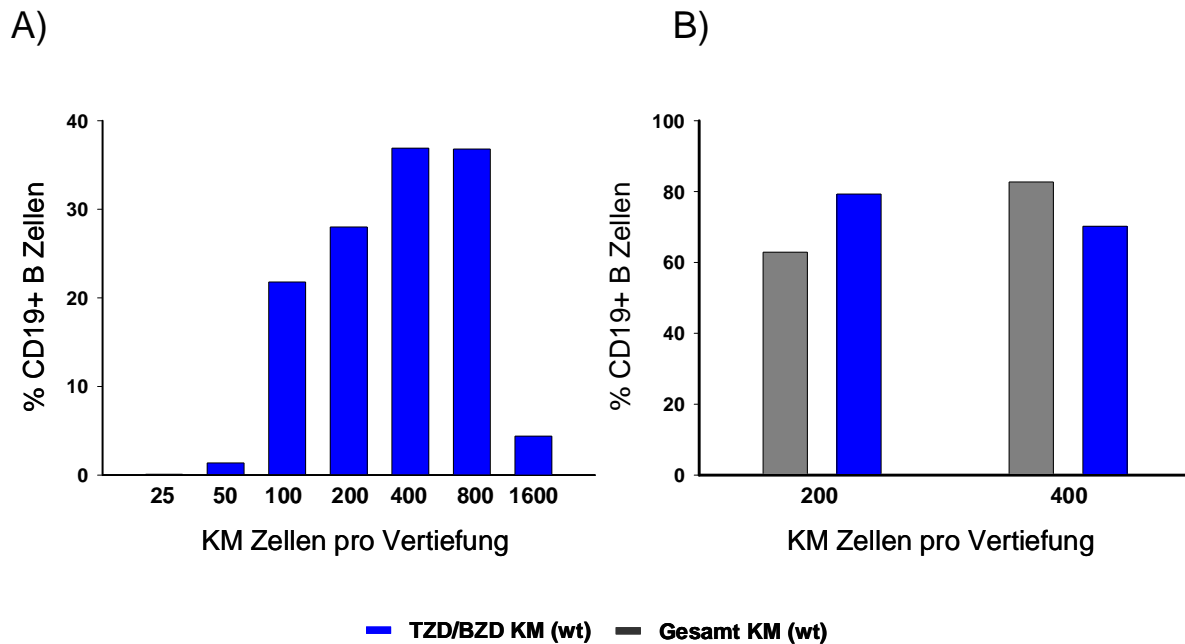


Abb. 3.32: Bestimmung der optimalen Anzahl an KM-Zellen/Vertiefung und Vergleich von Gesamt- und TSD/BSD KM für das *in vitro* Kultursystem von B-Vorläuferzellen.

KM-Zellen aus wt C57BL/6 Mäusen blieben entweder unbehandelt (Gesamt KM, graue Balken) oder wurden mittels MACS-System T- und B-Zell-depletiert (TSD/BSD KM, blaue Balken) und anschließend in Gegenwart von IL-7 auf bestrahlten ST-2 Stromazellen für 7 Tage bei 37 °C inkubiert. (A) Titration der KM-Zellen zur Feststellung der optimalen Aussaatdichte. (B) Vergleich des prozentualen Anteils an B-Zellen in Kulturen von Gesamt KM und TSD/BSD KM. Für die einmalig durchgeführte durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen aus jeweils 5 Parallelkulturen vereinigt.

3.5.1.2 B-Zell-Rekonstitution *in vitro* aus KM von Tieren mit und ohne GVHD

Um Unterschiede hinsichtlich Anzahl und Funktionstüchtigkeit von CLP in Transplantatempfängern mit (TSD KM + Tconv) und ohne GVHD (TSD KM) aufzudecken und den Einfluss ko-transplanterter Treg-Zellen (Schutz vor GVHD) auf die B-Zell-Rekonstitution zu überprüfen, wurde das KM aus diesen Tieren isoliert (TSD KM- und TSD KM + Tconv + Treg-Gruppe Tag 100, TSD KM + Tconv-Gruppe Tag des Versterbens) und 200 bzw. 400 Zellen/Vertiefung im ST-2 Kultursystem für 7 Tage inkubiert. Als Kontrolle dienten KM-Zellen aus unbehandelten C57BL/6 Tieren. Erwartungsgemäß enthielten alle Kulturen aus nicht-GVHD Tieren (TSD KM-Gruppe) und aus unbehandelten Tieren einen B-Zell-Anteil von 20-80 %, unabhängig davon ob 400 oder nur 200 KM-Zellen/Kultur eingesetzt worden waren. Im Gegensatz hierzu fand in keiner Kultur von KM-Zellen aus Tieren mit GVHD eine nachweisbare B-Zellentwicklung statt. Dies zeigt, dass in diesen Tieren nicht nur die B-Zell-Reifung aus determinierten Vorläuferzellen inhibiert ist, sondern dass schon Defizite auf der Ebene der CLP vorliegen (Abb. 3.33). Tiere, die nach Ko-Transplantation von Treg-Zellen vor GVHD geschützt waren (TSD KM + Tconv + Treg), zeigten hingegen eine B-Zell-Rekonstitution im Kultursystem, was unterstreicht, dass Treg-Zellen nicht nur die klinischen

Zeichen der GVHD verhindern, sondern auch vor der GVHD-induzierten KM-Schädigung schützen.

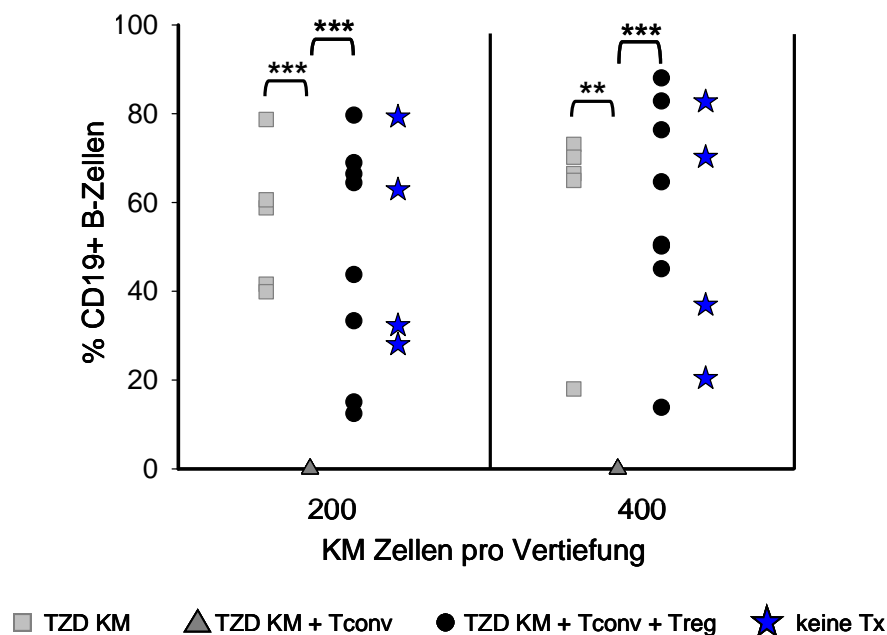


Abb. 3.33 : Analyse der B-Zell-Rekonstitution *in vitro* aus KM von Tieren mit und ohne GVHD.

Für die Untersuchung der B-Zell-Rekonstitution in einem *in vitro* Kultursystem wurden KM-Zellen von Mäusen isoliert, die entweder mit TZD KM (■; n= 5), TZD KM + Tconv (▲; n= 6) oder TZD KM + Tconv + Treg (●; n= 8) transplantiert worden waren. 200 oder 400 KM-Zellen/Vertiefung wurden für 7 Tage in Gegenwart von IL-7 auf einen semikonfluenten Rasen bestrahlter muriner ST-2 Stomazellen inkubiert. Der prozentuale Anteil an CD19⁺ B-Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Als Kontrolle dienten KM-Zellen unbehandelter C57BL/6 Mäuse (★; n= 4). Die Sternchen kennzeichnen die Signifikanz (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, one-way ANOVA mit anschließendem post-hoc-Test nach Tukey).

3.6 Bestimmung des B-Zell-Rekonstitutionspotentials *in vivo* im KM-Retransplantationsmodell

Parallel zu den *in vitro* Versuchen wurde das B-Zell-Rekonstitutionspotential von KM aus Tieren mit und ohne GVHD auch *in vivo* getestet. Dazu wurde den Tieren entweder zum Zeitpunkt ihrer tierschutzrechtlichen Tötung (zwischen Tag 40 und Tag 50 nach Transplantation) oder am Ende des Beobachtungszeitraums von 100 Tagen das KM entnommen, mittels MACS die T-Zellen im KM depletiert und danach in letal bestrahlte BALB/c Mäuse transferiert. **Abb. 3.34** zeigt den Versuchsverlauf und die eingesetzten Zellmengen.

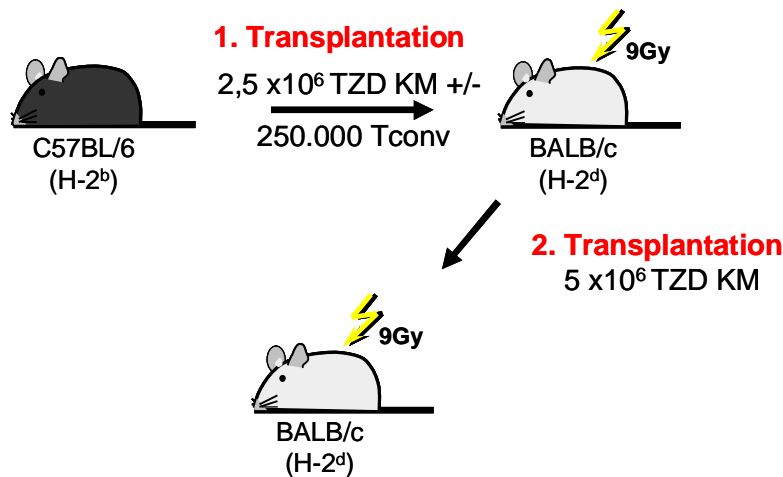


Abb. 3.34: Retransplantation von KM aus Empfängertieren mit und ohne GVHD.

BALB/c (H-2^d) Mäuse wurden mit 9Gy letal bestrahlt und mit $2,5 \times 10^6$ TZD Knochenmarkszellen alleine oder zusammen mit 250.000 Tconv aus C57BL/6 (H-2^b) Spendermäusen allogene transplantiert (1. Transplantation). KM aus diesen Tieren wurde entweder zwischen Tag 40 und 50 nach Transplantation (GVHD-Gruppe; Tag des Versterbens) oder an Tag 100 (KM-Kontrollgruppe) entnommen, wiederum T-Zell-depletiert und je 5×10^6 Zellen in letal bestrahlte BALB/c Mäuse retransplantiert (2. Transplantation).

In den sekundären Empfängermäusen wurden zunächst Gewichtsverlauf und Überleben dokumentiert (**Abb. 3.35 A und B**).

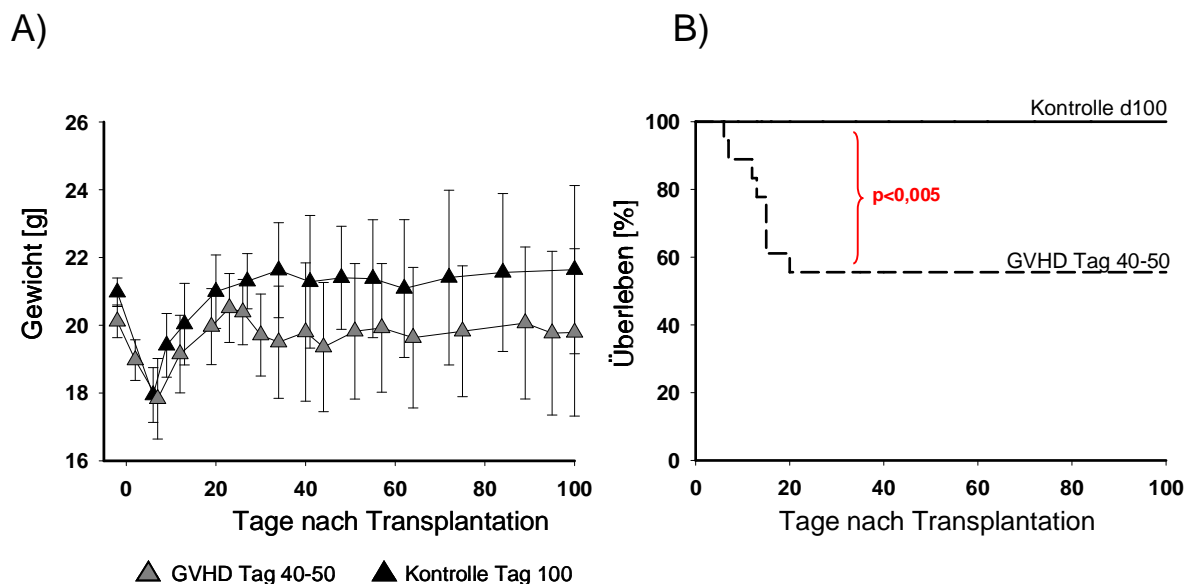


Abb. 3.35: Gewichtsverlauf und Überleben der sekundären BALB/c Empfängermäuse.

BALB/c Mäuse (H-2^d) wurden mit 9Gy letal bestrahlt und mit 5×10^6 TZD KM retransplantiert, welches aus Mäusen mit (GVHD d40-50, $n = 18$) und ohne GVHD (Kontrolle d100, $n = 12$) reisoliert worden war. Gezeigt sind Gewichtsverlauf (A) und Überleben (B) von Tieren aus 2 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD). Der Unterschied hinsichtlich des Überlebens der Tiere zwischen der Kontroll- und der GVHD- Gruppe ist statistisch signifikant ($p < 0,005$; nach Kaplan Meier).

Wie in den bisherigen Experimenten kam es zu einem anfänglichen Gewichtsverlust in Folge der Strahlenbelastung. Danach erreichten fast alle Tiere innerhalb von 14 Tagen wieder ihr Ausgangsgewicht, wobei das der GVHD-KM Empfängertiere konstant etwas unter dem der Kontroll-KM Empfängertiere lag. Während alle Empfängermäuse, die TZD Knochenmark aus GVHD-freien Tieren erhalten hatten, den Beobachtungszeitraum überlebten, war dies nur bei 55 % der Tiere der Fall, die TZD KM aus GVHD-Tieren erhalten hatten. Die Überlebensrate lag damit signifikant unter der in den Tieren der Kontrollgruppe.

3.6.1.1 Verlauf der B- und T-Zell-Rekonstitution in peripherem Blut, KM und Milz sekundärer Empfängertiere

Neben Gewichtsverlauf und Überleben der Tiere wurde auch die Immunzellrekonstitution in Abhängigkeit von der Herkunft des retransplantierten KM dokumentiert. Dazu wurde den sekundären Empfängertieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation Blut entnommen und analysiert. Zusätzlich wurde die Zellzusammensetzung in KM und Milz zum Ende des Beobachtungszeitraums (Tag 100) durchflusszytometrisch bestimmt. **Abb. 3.36 A** zeigt den zeitlichen Verlauf der B-Zell-Rekonstitution in den einzelnen Gruppen. Mäuse mit TZD KM aus der KM-Kontroll-Gruppe zeigten unter den MNZ nach 3 Wochen $15,6 \pm 11,4$ % B-Zellen im peripheren Blut. Dieser Anteil stieg bis Woche 12 auf $32,4 \pm 17$ % an und blieb danach konstant. Im Gegensatz dazu zeigten Empfängertiere von GVHD-KM sowohl nach 3 als auch nach 6 Wochen noch eine verminderte B-Zell-Rekonstitution ($8,8 \pm 6,3$ % bzw. $13 \pm 5,6$ %), die sich erst nach 12 Wochen ($33,1 \pm 14,8$ %) der Kontrollgruppe annäherte und damit den Normalwert erreichte. Die anfänglichen Unterschiede waren allerdings nicht statistisch signifikant.

Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, bei denen Tieren mit und ohne GVHD KM zeitgleich an Tag 27 KM entnommen wurde und dieses nach T-Zell-Depletion in letal bestrahlte BALB/c Empfängertiere retransplantiert wurde. Die B-Zell-Rekonstitution im peripheren Blut der sekundären Empfängertiere entsprach auch in diesen Ansätzen dem oben beschriebenen Verlauf. Die GVHD-KM-Empfängermäuse zeigten eine gegenüber der KM-Kontrollgruppe verzögerte B-Zell-Rekonstitution bis Woche 12, zum Ende des Beobachtungszeitraums erreichten aber beide Gruppen Normalwerte.

Im Unterschied zur B-Zell-Regeneration wurden bei der Rekonstitution des T-Zell-Kompartiments keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen. Drei Wochen nach Transplantation von KM aus GVHD-freien Spendern waren $15,3 \pm 6,2$ % periphere T-Zellen nachweisbar, nach Transplantation von TZD KM aus GVHD-Tieren $16,4 \pm 12,6$ %. Der prozentuale Anteil peripherer T-Zellen stieg in beiden Gruppen im weiteren Verlauf noch leicht an ($25 \pm 8,6$ % bzw. $25,7 \pm 9,9$ % bis Woche 17) (**Abb. 3.36 B**).

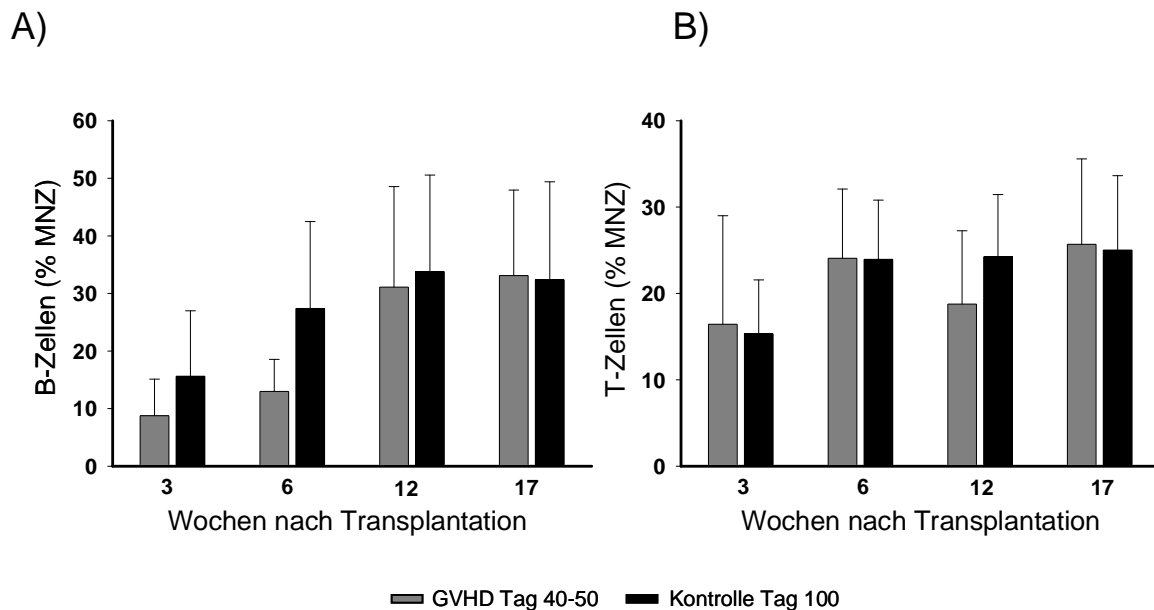


Abb. 3.36: Prozentualer Anteil der B- und T-Zellen im peripheren Blut nach Transplantation von KM aus Spendertieren mit und ohne GVHD.

Für die Untersuchung der B- und T-Zell-Rekonstitution im peripheren Blut wurden sekundäre Empfängertiere von Kontroll-KM oder GVHD-KM analysiert. Die Detektion erfolgte durchflusszytometrisch zu den angegebenen Zeitpunkten. Insgesamt wurden 8-12 Tiere aus zwei unabhängigen Versuchen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

Nach Ablauf des Beobachtungszeitraums wurden den Tieren KM und Milz entnommen, die Zellzahl bestimmt und die Zellzusammensetzung durchflusszytometrisch analysiert. Während es bezüglich der Gesamtzellzahl im KM keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gab ($18,6 \pm 4,7 \times 10^6$ Kontrolle Tag 100 und $16,8 \pm 1,6 \times 10^6$ GVHD Tag 40-50) (**Abb. 3.37**), zeigten sich in der Milz deutliche Unterschiede.

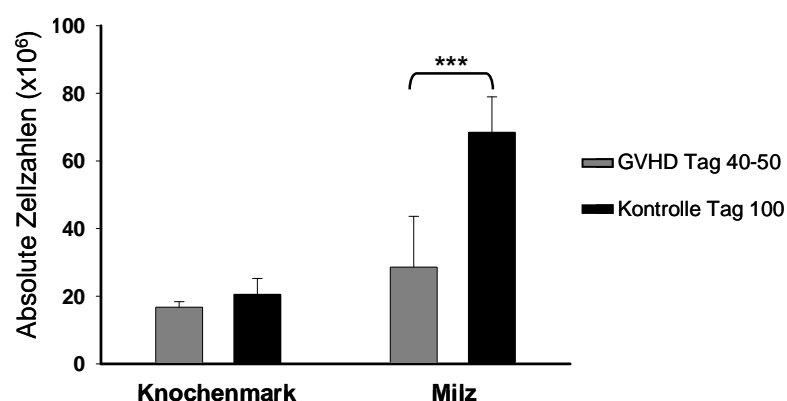


Abb. 3.37: Gesamtzellzahl reisolierter Leukozyten aus dem KM und der Milz von sekundären Transplantatempfängern.

Empfängertieren von Kontroll-KM oder GVHD-KM wurden an Tag 100 nach Transplantation KM und Milz entnommen und die jeweiligen Zellzahlen bestimmt. Insgesamt wurden 8-12 Tiere aus zwei unabhängigen Versuchen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) und die Sternchen kennzeichnen die Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, zweiseitiger Student's T-Test).

Am Ende des Beobachtungszeitraums lag die Gesamtmilzzellzahl in der KM-Kontroll-Gruppe bei $69,5 \pm 8,3 \times 10^6$ Zellen und damit im Normalbereich, während sie in der GVHD-KM-Gruppe mit nur $28,6 \pm 15 \times 10^6$ Zellen signifikant erniedrigt war.

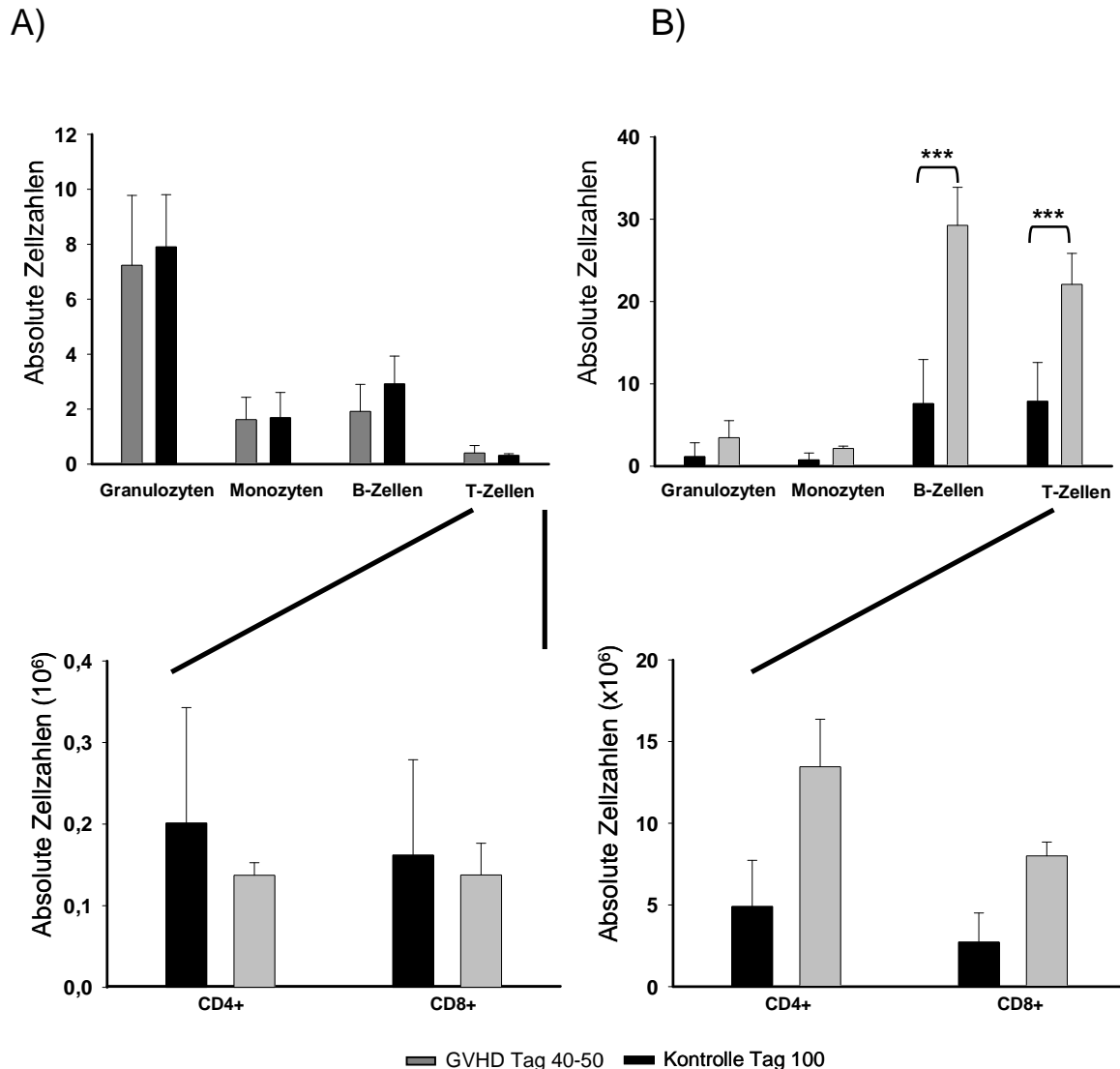


Abb. 3.38: Leukozytäre Zusammensetzung reisolierter Milz- und Knochenmarkszellen nach Retransplantation von KM aus Spendertieren mit und ohne GVHD.

Organentnahme und durchflusszytometrische Analyse der zellulären Zusammensetzung von KM (A) und Milz (B) erfolgte an Tag 100 nach Retransplantation. Die Balken zeigen Mittelwerte von $n = 8-12$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Zellzahlen beziehen sich auf die gesamte Milz bzw. Femur und Tibia der beiden Hinterläufe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) und die Sternchen kennzeichnen die Signifikanz (* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, zweiseitiger Student's T-Test).

Bezüglich der Zellzusammensetzung im Knochenmark (**Abb. 3.38 A**) konnten 100 Tage nach der zweiten Transplantation keine signifikanten Unterschiede in den Granulozyten- und Monozytenzellzahlen festgestellt werden. Auch bezüglich der B- und T-Zellzahlen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Im Unterschied hierzu traten bei der Analyse der Milz (**Abb. 3.38 B**) deutliche und teils auch statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf. Vor allem bei den B- und T-Zellen zeigten die Empfänger von GVHD-KM eine gegenüber den Empfängern von Kontroll-KM signifikant verminderte Zellularität ($7,6 \pm 5,3 \times 10^6$ versus $29,3 \pm 4,6 \times 10^6$ bzw. $7,9 \pm 4,7 \times 10^6$ versus $22 \pm 3,8 \times 10^6$ für B- und T-Zellen), während sich bei der Anzahl der Monozyten und Granulozyten nur sehr diskrete Unterschiede zeigten.

Zusammenfassend zeigen sowohl die *in vitro* Experimente zur B-Zell-Rekonstitution als auch die Retransplantationsmodelle, dass die Anzahl von B-Vorläuferzellen im KM von GVHD-Tieren reduziert ist und die Rekonstitution der B-Lymphopoese aufgrund dieser Verminderung der CLP-Population *in vitro* gar nicht und *in vivo* nur verzögert erfolgt (in Abwesenheit eines GVHD-Zytokinmilieus *in vitro* bzw. im sekundären Empfänger). Die Regeneration der Myelopoese und die letztendlich vollständige Regeneration der B-Lymphozyten in sekundären Empfängertieren zeigt, dass das Stammzellkompartiment weitgehend intakt ist, obwohl die erhöhte Sterberate in Tieren die GVHD-KM erhalten hatten auch auf eine verminderte Engraftmentkapazität des Knochenmarkes von GVHD-Tieren hinweist. Die detaillierte quantitative und phänotypische Analyse hämatopoetischer Vorläuferzellen im KM von GVHD-Tieren ist Gegenstand derzeit laufender Untersuchungen

4 Diskussion

Die allogene Knochenmarktransplantation ist eine therapeutische Option für Patienten mit malignen und einigen nicht-malignen hämatologischen Erkrankungen. Dabei werden allogene Blutstammzellen auf einen Empfänger übertragen und die erkrankte Hämatopoese durch die Spenderhämatopoese ersetzt. Vor der Transplantation wird zur Ermöglichung des Engraftments der transplantierten Zellen eine Ganzkörperbestrahlung und/oder eine Hochdosis-Chemotherapie durchgeführt. Diese sogenannte Konditionierung muss ausreichend immunsuppressiv sein, um eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern, und soll in Abhängigkeit von der klinischen Situation suffiziente Antitumorstimmung entfalten, um ein Rezidiv maligner Erkrankungen zu verhindern. Die resultierende Immundefizienz führt jedoch zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen und kann bis zu einem Jahr nach Transplantation andauern. Die Regeneration eines funktionsfähigen Immunsystems nach Transplantation erfordert die Wiederherstellung des angeborenen und auch des adaptiven Immunsystems (199). Klinisch wird in aller Regel mit dem Engraftment eine schnelle Regeneration des angeborenen Immunsystems beobachtet (12-20 Tage), während die Wiedererlangung eines funktionsfähigen B- und T-Zell-Kompartiments längere Zeit benötigt (103). Ein Fehlen der B-Vorläuferzellen wurde in Patienten in den ersten Monaten und in einigen Fällen sogar für mehr als ein Jahr nach Transplantation beobachtet (115-117). Infektionen in der Frühphase nach Transplantation (Aplasiephase) werden durch eine Defizienz der Granulozyten und Monozyten verursacht. Die in der post-Engraftment-Periode auftretenden Infektionen sind überwiegend auf eine Defizienz der T-Zellen (200) und der B-Zellen (201) zurückzuführen. Solche Infektionen tragen wesentlich zur hohen Morbidität und Mortalität nach Transplantation bei. Für die Geschwindigkeit und Funktionalität der Immunrekonstitution nach allogener Transplantation spielen mehrere Faktoren eine Rolle, z.B. die CD34-Stammzell-dosis, die Art des Transplantats (KM versus PBSC) (202), das Alter der Patienten (203-205) und die Wahl und Dosis der zur Prophylaxe der GVHD eingesetzten Immunsuppressiva. Trotz prophylaktischer Immunsuppression kann es durch die im Transplantat enthaltenen reifen Spender-T-Zellen zum Auftreten einer GVHD kommen. Hierbei erkennen alloreaktive Spender-T-Zellen Antigene auf Empfängerzellen als fremd, was zu ihrer Aktivierung und Proliferation führt und anschließend eine Zerstörung typischer Zielorgane wie Haut, Darm, Leber und lymphatischer Organe zur Folge hat (69, 70). Die Stärke der GVHD hängt vom Grad der MHC-Inkompatibilität, dem genetischen Hintergrund von Spender und Empfänger (Familien- vs. Fremdspender) und von der Anzahl der transplantierten T-Zellen ab. Sowohl das Auftreten als auch die Behandlung der GVHD sind Faktoren, die die B-Zell-Lymphopoese nach allogener Stammzelltransplantation negativ

beeinträchtigen können. (206, 207). So zeigten Storek und Kollegen bereits 2001, dass der Grad der GVHD nach Transplantation mit der B-Zell-Rekonstitution invers korreliert. Patienten, die 30 Tage nach der Transplantation eine GVHD Grad II-IV entwickelten, hatten weniger B-Vorläuferzellen im Knochenmark als Patienten die keine (Grad 0), oder nur eine leichte (Grad I) GVHD aufwiesen (189). Schon in dieser Arbeit wurden potentielle Ursachen diskutiert. Einerseits kommt es durch die aktivierten Zellen während des durch die GVHD ausgelösten „Zytokinsturms“ zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, die die B-Zell-Lymphopoese inhibieren könnten. Hierzu zählen z.B. das durch die T-Zellen produzierte IFN- γ sowie das überwiegend durch Makrophagen freigesetzte IL-1 (114, 118). Als weitere Möglichkeit wurde die Zerstörung der für die B-Zell-Entwicklung benötigten Stromazellen (120) durch alloreaktive Spender-T-Zellen diskutiert (119, 208-211). Dieser sogenannte Spender-gegen-Stroma-Effekt (119, 193) könnte relevant sein, da die Stromazellen für viele Schritte in der frühen B- und T-Zellentwicklung entscheidende Stimuli liefern (120). Klinisch konnten diese potentiellen Immunmechanismen allerdings nie differenziert werden, da die zur GVHD-Therapie eingesetzte Immunsuppression (z.B. Glukokortikoide) ebenfalls für die verzögerte Immunrekonstitution verantwortlich sein könnte (113, 114). Eigene Beobachtungen in Tiermodellen der GVHD veranlassten uns deshalb, die immunologischen Mechanismen der verzögerten B-Zell-Rekonstitution bei GVHD im Rahmen dieser Dissertation näher zu untersuchen.

Hierfür wurde ein in unserer Arbeitsgruppe etabliertes allogenenes Mausmodell gewählt, in dem Spender- und Empfängermause unterschiedliche MHC-Haplotypen (kompletter MHC I und II mismatch) aufweisen und die GVHD durch die Ko-Transplantation von Milz-T-Zellen induziert wird. In der C57BL/6 (H-2^b) \rightarrow BALB/c (H-2^d) Stammkombination wird die akute GVHD vorwiegend durch CD4⁺ T-Zellen induziert, durch die Ko-Transplantation von CD8⁺ T-Zellen aber stark aggraviert (212). In den hier durchgeführten Versuchen wurde die GVHD jedoch ausschließlich durch die Gabe von CD4⁺CD25⁻ Tconv-Zellen induziert (102). Um zusätzlich sicherzustellen, dass die in den Tieren ausgelöste GVHD nur durch die gezielte und in definierten Mengen zum KM hinzu gegebenen Tconv-Zellen induziert wird, wurden vor der Transplantation die im KM enthaltenen T-Zellen mittels MACS depletiert (TZD KM). Dadurch wurde zudem verhindert, dass die im KM enthaltenen T-Zellen mit immunregulatorischer Wirkung (z.B. Treg-Zellen und NKT-Zellen) einer GVHD-Entwicklung entgegenwirken (190). Die Empfängermause wurden vor der Transplantation mittels Bestrahlung konditioniert. Diese Konditionierung stellt selbst bereits die erste Phase im pathophysiologischen Mechanismus der GVHD dar (213), da eine letale Bestrahlung zu einer Leuko- und Lymphopenie führt und somit Platz schafft für die spätere Expansion der alloreaktiven T-Zellen. Des Weiteren werden durch die Konditionierung Gewebeschäden im Empfänger induziert und die resultierende Zytokinausschüttung („Zytokinsturm“) führt zur

Aktivierung der Empfänger APC und fördert so die Aktivierung und Expansion der ko-transplantierten Spender-T-Zellen (87). Mehrere Untersuchungen zeigten, dass die Konditionierung und die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine Mucosaschädigungen im Darm hervorrufen und dadurch eine Translokation von Lipopolysacchariden (LPS) aus dem Darmlumen in die Zirkulation ermöglichen. Dies führt zur Ausschüttung von TNF durch aktivierte Makrophagen und zur weiteren Aktivierung der Empfänger APC (75). In den hier durchgeführten Experimenten wurden die letal bestrahlten BALB/c Empfängertiere einen Tag nach Konditionierung entweder mit TZD KM alleine (KM-Gruppe) oder mit TZD KM und Tconv Zellen (GVHD-Gruppe) aus MHC-differenten C57BL/6 Mäusen transplantiert. Die Gabe der Tconv Zellen erfolgte versuchsabhängig entweder an Tag 0 zusammen mit dem TZD KM oder nachträglich an Tag 2. Die Tiere der GVHD-Gruppe entwickelten im Unterschied zur KM-Gruppe im Verlauf die typischen Anzeichen einer GVHD (69). Sie verloren über den gesamten Beobachtungszeitraum stark an Gewicht und entwickelten eine Diarrhoe. Während im verwendeten Modell keine histopathologischen Veränderungen an der Haut und der Leber auftraten (69, 70), zeigte sich im Darm der Tiere eine massive lymphozytäre Infiltration und begleitend eine ausgeprägte Zerstörung der Gewebearchitektur. Des Weiteren stieg über den Beobachtungszeitraum der klinische GVHD Score kontinuierlich an und alle Mäuse verstarben innerhalb von 60 Tagen an den Folgen ihrer Erkrankung. Damit erschien das gewählte Modell geeignet den Einfluss der schweren akuten GVHD auf die Immunrekonstitution zu untersuchen.

Durch serielle Blutuntersuchungen konnte in Tieren mit GVHD zwar eine rasche Erholung des myeloischen Kompartiments nachgewiesen werden, nicht aber eine Rekonstitution der B-Lymphozyten und nur eine deutlich verminderte Rekonstitution der T-Lymphozyten. Da im verwendeten Mausmodell keine Medikamente zur GVHD Prophylaxe oder Therapie eingesetzt wurden, konnte diese gestörte B-Zell-Rekonstitution lediglich auf immunologische Mechanismen im Rahmen der GVHD zurückgeführt werden. Neben den zuvor erwähnten Zielorganen Haut, Darm und Leber können von einer GVH-Reaktion auch lymphatische Gewebe betroffen sein (105, 110, 111). Durch Bestimmung der Gesamtzellzahlen der Milz konnte in Tieren der GVHD-Gruppe tatsächlich eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigte Zellzahl detektiert werden. In ähnlichen Studien von Cohen *et al.* (187) wurden in einem haploidenten Transplantationsmodell letal bestrahlte [BALB/c x C3H] F1 (H-2^{dk}) Mäuse mit 5×10^6 TZD KM aus BALB/c (H-2^d) Spendermäusen alleine, oder zusammen mit 10×10^6 BALB/c T-Zellen, transplantiert. Empfängertiere, die im Versuchsverlauf eine GVHD entwickelt hatten, zeigten an Tag 45 ebenfalls eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringerte Anzahl an Gesamtmilzzellen und wiesen eine Atrophie der Milz sowie eine Lymphopenie auf. Zusätzlich wurde, in Übereinstimmung mit meinen Ergebnissen, ein vollständiger Verlust von B- (B220⁺) und T-Zellen (CD3⁺) in der Milz beobachtet. Insofern

könnte alleine die Zerstörung peripherer Lymphorgane für die insuffiziente Immunrekonstitution bei GVHD verantwortlich sein. Im Unterschied zur Arbeit von Cohen *et al.* wurde in der vorliegenden Arbeit neben der Milz aber auch das KM hinsichtlich des prozentualen Anteils sowie der absoluten Anzahl an B- (CD19⁺) und T-Zellen (TCR β ⁺) analysiert. Dabei zeigte sich in der GVHD-Gruppe, im Unterschied zur KM-Gruppe, auch ein vollständiges Fehlen des B- und eine starke Verminderung des T-Zell-Kompartiments. Durch die Verwendung des Oberflächenmarkers CD19, der bereits auf Pro-B-Zellen im KM exprimiert und erst mit der terminalen Differenzierung reifer B-Zellen zu Plasmazellen wieder herunter reguliert wird (214), konnte somit gezeigt werden, dass die GVHD die Immunrekonstitution nicht nur durch die Zerstörung peripherer Lymphorgane beeinträchtigt, sondern dass sie zumindest die B-Zell-Differenzierung bereits auf der Stufe unreifer Vorläuferzellen im Knochenmark inhibiert.

Auch für die T-Zell-Reihe wurde eine Beeinträchtigung des primären Lymphorgans, nämlich des Thymus, durch die GVHD beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die T-Zell-Rekonstitution invers mit der Schwere der GVHD korreliert (111, 215, 216). Auch hierzu tragen unspezifische Schädigungen bei, da die Konditionierung die Thymusstruktur und dessen Funktion stark beeinträchtigen kann (217, 218). Die T-Zell-Entwicklung im Thymus ist ähnlich der B-Zell-Entwicklung im KM von Signalen abhängig, die über ein Netzwerk von Stromazellen vermittelt werden (219). Diese Stromazellen (*thymic epithelial cell*, TEC) werden phänotypisch und funktionell in verschiedene Subpopulationen unterteilt (219, 220) und sind für die Positivselektion von T-Vorläuferzellen verantwortlich und fördern so deren Überleben, Expansion, Migration und Differenzierung. Die Arbeitsgruppe um G. Holländer zeigte, dass die akute GVHD selbst in einem bestrahlungsunabhängigen Transplantationsmodell die Struktur und Zusammensetzung des thymischen Milieus beeinträchtigen kann (221). Die Veränderungen waren gekennzeichnet durch die Verringerung oder den vollständigen Verlust von TEC Subpopulationen, was mit der Einwanderung reifer alloreaktiver Spender-T-Zellen in den Thymus assoziiert war. Sie konnten zeigen, dass TEC durch ihre MHC-Expression allogene Spender-T-Zellen *in situ* aktivieren und diese dann in einem IFN- γ -abhängigen Prozess Apoptose in den TEC induzieren (222). Sie schlossen daraus, dass die gestörte T-Zell-Rekonstitution bei GVHD vor allem durch die Zerstörung der Thymusarchitektur hervorgerufen wird und versuchten in tierexperimentellen und klinischen Studien, die Reparaturvorgänge im Thymus durch Keratinozytenwachstumsfaktor (*keratinocyte growth factor*, KGF) zu unterstützen (223, 224). Die in dieser Promotionsarbeit durchgeführten Knochenmarkuntersuchungen weisen nun aber erstmals darauf hin, dass die GVHD sowohl die B-Zellrekonstitution als auch die T-Zellrekonstitution nicht nur peripher (in Milz, Lymphknoten und Thymus) beeinträchtigt, sondern dass sie bereits lymphatische Vorläuferzellen im KM empfindlich stört.

Im Gegensatz zu Tieren mit GVHD konnte in Tieren ohne GVHD (KM-Gruppe) eine quantitativ normale B- und T-Zell-Rekonstitution beobachtet werden. Um darüber hinaus Hinweise zur Funktionalität der angewachsenen B-Zellen zu erhalten, wurden die Tiere mit dem T-Zell-abhängigen (TD) Hapten-Träger-Komplex TNP-OVA immunisiert und anschließend die Entwicklung einer antigenspezifischen Immunantwort anhand von TNP-spezifischem IgG im Serum der Tiere verfolgt. Die Induktion einer Antikörper-Antwort auf TD-Antigene ist komplex und benötigt die Hilfe von CD4⁺ Th-Zellen (225). Sie ist gekennzeichnet durch die Bildung von Keimzentren in der Milz (germinal centers, GC), in denen der Klassenwechsel und die Affinitätsreifung der B-Zellen sowie die Differenzierung zu Gedächtniszellen stattfindet (226). TNP, das als Hapten für sich alleine keine Antikörperantwort auslösen kann, muss dazu an ein Trägerprotein mit Th-Zellepitopen, wie z.B. Ovalbumin (OVA), gekoppelt werden. Zum Zeitpunkt der 1. Immunisierung (Tag 42 nach KMT) zeigten die Tiere der KM-Gruppe bereits eine weitgehend vollständige Rekonstitution der B-Zellen im peripheren Blut und auch ihr Serumgehalt an IgM und IgG entsprach weitgehend dem nicht-transplantierten Kontrolltiere. Im Gegensatz dazu konnten in der GVHD-Gruppe - mit Ausnahme eines Tieres - weder zu diesem Zeitpunkt noch später B-Zellen im peripheren Blut detektiert werden. Allerdings enthielt auch das Serum dieser Tiere noch signifikante Mengen an IgM und IgG, das auf Grund der Halbwertszeit von Immunglobulinen vermutlich überwiegend noch von den zwischenzeitlich eliminierten Empfänger-B-Zellen stammte. Im Verlauf der Immunisierung entwickelte die KM-Gruppe eine TNP-spezifische humorale Immunantwort. Dabei konnten bereits nach der Grundimmunisierung bei allen Tieren antigenspezifische IgG-Antikörper nachgewiesen werden und alle Tiere zeigten nach der zweiten Immunisierung einen weiteren Titeranstieg. Dagegen fanden sich in der GVHD-Gruppe lediglich in dem einen Tier, welches zuvor nur eine sehr milde GVHD entwickelt und in der Folge eine gewisse B-Zell-Rekonstitution im peripheren Blut gezeigt hatte, TNP-spezifische Antikörper im Serum. Diese Experimente machen deutlich, dass das nach einer allogenen Stammzelltransplantation rekonstituierte Immunsystem prinzipiell wieder zur Ausbildung einer antigenspezifischen, T-Zell-abhängigen humoralen Immunantwort fähig ist, vorausgesetzt es wird nicht durch das Auftreten einer schweren akuten GVHD in seiner Entwicklung gestört.

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass im MHC-differenten C57BL/6 → BALB/c Transplantationsmodell der Transfer großer Mengen von Spender-Treg-Zellen zu einem >90 % Schutz der Empfängertiere vor einer letalen GVHD führt (100, 102). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass der alleinige Transfer von Treg-Zellen keine GVHD induziert und die Alloreaktion von Tconv Zellen hauptsächlich dadurch inhibiert wird, dass die frühe Expansion der Zellen unterdrückt wird (100, 182, 184). Eine Suppression der Expansion von Tconv-Zellen konnte sowohl in den sekundären Lymphorganen als auch in den GVHD Zielorganen

nachgewiesen werden, was indirekt zu einer verminderten Akkumulation proinflammatorischer Zytokine (z.B. IFN γ und TNF) im Serum führte (100). Die für den Schutz vor GVHD entscheidende Interaktion zwischen Treg und Tconv Zellen scheint in den sekundären Lymphorganen statt zu finden, da CD62L⁺ Treg-Zellen im Vergleich zu CD62L⁻ Treg-Zellen deutlich besser vor GVHD schützten (101). CD62L ist ein Homingfaktor für sekundäre Lymphorgane und unterstützt als solcher die effiziente Einwanderung von Lymphozyten in periphere Lymphknoten (101). Dort kommt es in der Folge zur Aktivierung der Treg (wie auch der Tconv) Zellen durch lokale APC und dadurch zur Induktion ihrer suppressiven Aktivität (nur aktivierte Treg-Zellen sind suppressiv) (227). Interessanterweise führt deren suppressive Aktivität trotz Inhibition der GVHD nicht zu einem gleichzeitigen Verlust des ebenfalls durch die Tconv Zellen vermittelten GvL-Effekts, wie Edinger *et al.* mittels eines nicht-invasiven Biolumineszenzbildgebungsverfahrens (BLI) in verschiedenen Leukämie- und Lymphommodellen nachweisen konnten (100, 228). Um den Einfluss ko-transplantierte Spender-Treg-Zellen auf die Immunrekonstitution (und hier speziell auf die Rekonstitution des B-Zellkompartiments) zu untersuchen, wurden Mäuse nicht nur mit TZD KM und Tconv-Zellen, sondern gleichzeitig auch mit hochreinen natürlichen Treg-Zellen im Verhältnis 1:1 zu den Tconv Zellen transplantiert (Treg-Gruppe). Basierend auf Daten von Robert Negrin's Gruppe in Stanford, die zeigten dass die vorzeitige Verabreichung von Treg-Zellen zu einem besseren Schutz vor GVHD führt (191), wurden die Spender-Tregs in meinen Versuchen an Tag 0 zusammen mit dem TZD KM transplantiert, während die Tconv-Zellen an Tag 2 nachträglich verabreicht wurden. Die Treg-behandelten Empfängermäuse überlebten zu 100 % und auch bezüglich des Gewichtes und des klinischen GVHD Scores wurden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zur KM-Gruppe festgestellt. Im Unterschied zur GVHD-Gruppe zeigte sich im peripheren Blut der Treg-behandelten Tiere bereits an Tag 21 nach Transplantation prozentual ein hoher Anteil an rekonstituierten Spender-B-Zellen, der nur geringfügig, jedoch statistisch signifikant unter dem der KM-Gruppe lag. Über den Zeitverlauf stieg die B-Zellzahl in der Treg-Gruppe weiter an und erreichte am Ende des Beobachtungszeitraums die Werte von Tieren der KM-Gruppe und somit auch die unbehandelten (nicht transplantierten) C57BL/6 Tiere.

Die gegenüber der KM-Gruppe leicht verzögerte B-Zell-Rekonstitution in der Treg-Gruppe könnte damit zu erklären sein, dass es trotz der Ko-Transplantation der Treg-Zellen anfangs durch die Tconv Zellen zur Induktion einer subklinischen Alloreaktion in den Empfängertieren kommt, welche die B-Lymphopoese in der Frühphase nach Transplantation beeinträchtigt. Durch die Zuhilfenahme der BLI-Technologie konnte in früheren Studien das Migrationsverhalten Luciferase-exprimierender (Luc⁺) Tconv Zellen nach ihrem Transfer entweder alleine oder zusammen mit Treg-Zellen *in vivo* in Echtzeit verfolgt werden (100). Bei einem Ko-Transfer von Treg-Zellen zeigte sich 7 Tage nach Transplantation keine

Änderung des Verteilungsmusters der Luc⁺ Tconv Zellen, wohl aber eine deutliche Reduktion (93 %) des BLI-Signals. Ebenso zeigten Analysen der absoluten Zellzahlen 5 Tage nach Transfer eine ca. 70-prozentige Suppression der frühen Expansion von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen in Milz, Leber und mesenterialen Lymphknoten, sowie eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine im Serum. Diese Befunde weisen darauf hin, dass Treg-Zellen nicht zu einer Depletion alloreaktiver T-Zellen führen, sondern lediglich ihre Expansion limitieren. Insofern ist verständlich, dass eine transiente Alloreaktion hervorgerufen werden kann und damit die B-Lymphopoese zumindest transient beeinträchtigt wird. Am Ende des Beobachtungszeitraumes von 100 Tagen wurde in den Tieren der Treg-Gruppe jedoch weder im Knochenmark noch in der Milz eine gegenüber der KM-Gruppe verminderte Zellzahl festgestellt und in beiden Organen zeigte sich eine nahezu vollständige Rekonstitution von CD19⁺ B- und TCR⁺ T-Zellen. Der Einfluss von Treg-Zellen auf die Immunrekonstitution nach Transplantation wurde auch von Nguyen und Kollegen untersucht (229). In einem MHC-differenten Mausmodell (ähnlich dem hier eingesetzten) führte der adoptive Transfer von Treg-Zellen zusammen mit Tconv-Zellen im Verhältnis 1:1 ebenfalls zu einer verbesserten Rekonstitution lymphatischer Zellen nach Transplantation. Zudem wurde gezeigt, dass die Thymusstruktur der Treg-Gruppe keine Unterschiede zur KM-Gruppe aufwies. Damit wurde deutlich, dass durch die zusätzliche Gabe von Treg-Zellen zumindest die TEC im Thymus vor einer Zerstörung durch alloreaktive Tconv-Zellen geschützt sind. Anhand der von mir durchgeführten Immunisierungsexperimente, bei denen sich hinsichtlich des antigenspezifischen IgG-Antikörpertiters im Serum kein Unterschied zwischen der KM- und der Treg-Gruppe feststellen ließ, konnte zusätzlich nun auch die volle Funktionsfähigkeit der in der Treg-Gruppe rekonstituierten B- und T-Zellen nachgewiesen werden. Zusammengefasst zeigte sich somit, dass in allogenen transplantierten Tieren ohne GVHD ein funktionsfähiges, adaptives Immunsystem entstehen kann, während dessen Entwicklung beim Auftreten einer GVHD empfindlich gestört wird. Der gestörten Immunrekonstitution liegt nicht nur die Schädigung peripherer Lymphorgane zugrunde, sondern die GVHD verursacht bereits eine Reifungsblockade von frühen B- und T-Vorläuferzellen im KM. Der Ko-Transfer von Treg-Zellen zusammen mit den GVHD-induzierenden Tconv-Zellen schützt die Tiere nicht nur vor den klinischen Symptomen einer GVHD, sondern führt auch, wie anhand der erfolgreichen Ausbildung einer humoralen Immunantwort gezeigt, zu einer deutlichen Verbesserung der B- und T-Zell-Rekonstitution.

In den bisher diskutierten Versuchen wurde die B- und T-Zell-Rekonstitution im KM und in der Milz der GVHD-Gruppe entweder zum Zeitpunkt ihres Versterbens oder ihrer tierschutzrechtlichen Tötung (meist zwischen Tag 40 und Tag 60 nach KMT) und in den Tieren der KM-Gruppe zum Ende des Beobachtungszeitraums (100 Tage nach KMT) analysiert. Um Aufschlüsse über den Verlauf der B- und T-Zell-Rekonstitution sehr früh nach

Transplantation zu erhalten und dabei gleichzeitig Hinweise über den Verbleib der als Bestandteil des KM mittransplantierten reifen Spender-B-Zellen sowie über das Verhalten der ko-transplantierten reifen Spender T-Zellen zu erhalten, wurde zusätzlich ein Transplantationsmodell verwendet, bei dem das Transplantat aus den Zellen zweier kongener Mausstämme zusammengesetzt wurde (kTZD). So konnte anschließend mittels multiparametrischer durchflusszytometrischer Analyse zwischen residuellen Empfängerzellen einerseits (anhand der HLA-Unterschiede) und ko-transplantierten reifen bzw. bereits neu aus dem Transplantat rekonstituierten Spenderzellen andererseits (anhand des kongenen Markers) unterschieden werden. Bei diesen Ansätzen ließen sich in der KM-Gruppe bereits zu sehr frühen Zeitpunkten nach KMT (d7 und d14) aus dem transplantierten KM rekonstituierte Spender-B-Zellen im KM und etwas zeitverzögert dann auch in der Milz nachweisen. Dies spiegelt den normalen Ablauf einer B-Lymphopoese wieder, bei der zuerst im Knochenmark unreife B-Zellen aus hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen entstehen, die dann über das PB in die Milz und die peripheren Lymphknoten gelangen, wo sie nach Antigen-Kontakt weitere Reifungs- und Differenzierungsschritte durchlaufen (230). Darüber hinaus konnten sowohl residuelle Empfänger- als auch die zusammen mit dem Transplantat infundierten reifen Spender-B-Zellen zu allen Zeitpunkten detektiert werden. Im Gegensatz dazu kam es nach Ko-Transplantation von Tconv-Zellen (GVHD-Gruppe) nur zur marginalen und transienten B-Zell-Rekonstitution, mit sehr raschem Verlust sowohl der Empfänger-B-Zellen als auch der im Transplantat enthaltenen reifen Spender-B-Zellen.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde der Einfluss von Empfänger-B-Zellen auf die Entwicklung einer akuten GVHD untersucht (231). Hier konnte gezeigt werden, dass Empfänger-B-Zellen in einem inflammatorischen Mikromillieu vorübergehend eine durch CD4⁺ T-Zellen vermittelte akute GVHD abmildern können. Der Schutz zeigte sich durch eine verminderte Expansion und IFN- γ Produktion der Spender-T-Zellen nach Transplantation. Die Empfänger B-Zellen, in der Literatur als 'regulatorische B-Zellen' (Breg-Zellen) bezeichnet, produzierten als Antwort auf die Ganzkörperbestrahlung das antiinflammatorische Zytokin IL-10, welches für die abgeschwächte GVHD (mit)verantwortlich war.

Ähnlich den Empfänger-B-Zellen wurden auch die Spender-B-Zellen hinsichtlich ihrer Rolle bei der GVHD mehrfach untersucht, mit teilweise kontroversen Ergebnissen. So zeigten u.a. Schultz *et al.*, dass diese Population als APC fungieren und so zur Pathophysiologie der GVHD beitragen kann (232). Ebenso fanden Lori *et al.* (233) in Patienten, die HLA-identische allogene PBSC (*peripheral blood stem cells*) erhalten hatten, dass eine erhöhte Anzahl an reifen Spender-B-Zellen im Transplantat mit einer erhöhten GVHD Inzidenz und einer erhöhtem TRM (*treatment related mortality*) korrelierte. Im Gegensatz dazu kam es in der Studie von Lori und Kollegen (234), in der nicht periphere

Stammzellen sondern Knochenmark transplantiert wurde, zu einer inversen Korrelation zwischen der absoluten Anzahl an B-Zellen im Transplantat und dem Auftreten einer GVHD. Eine mögliche Erklärung für diese auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse könnte in der unterschiedlichen Zusammensetzungen der B-Zellpopulation in KM und peripherem Blut liegen: Während im KM mehr unreife B-Zellen und B-Zell-Vorläufer enthalten sind, die erst im Empfänger ausdifferenzieren und dabei vermehrt auch einen potentiell tolerogenen Phänotyp erlangen können, beinhaltet das periphere Blut vor allem reife und damit vollständig immunkompetente B-Zellen. Inwiefern diese in der Literatur erwähnten immunregulatorischen Effekte von Spender- und Empfänger-B-Zellen in dem hier gewählten Modell von Bedeutung sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Allerdings spricht die Tatsache, dass selbst in den Tieren ohne GVHD (KM-Gruppe) schon früh nach KMT (vermutlich als Folge der hohen Stahleindosis) nur noch wenige B-Zellen des Empfängers im KM und in der Milz nachweisbar waren, eher gegen einen signifikanten Einfluss dieser Population auf den beobachteten Krankheitsverlauf.

Früh nach allogener KMT waren in den Tieren der GVHD-Gruppe nicht nur keine B-Zellen, sondern auch keine nennenswerten Mengen an rekonstituierten T-Zellen in den untersuchten Organen zu finden. Dies lässt vermuten, dass sich die bereits erwähnte Schädigung des Thymus relativ rasch manifestiert. Gestützt wird diese Vermutung durch die in diesen Tieren sehr früh zu beobachtende starke Expansion der ko-transplantierten reifen Spender-Tconv-Zellen, die durch die hohe Frequenz alloreaktiver T-Zellen und die stahleninduzierte Lymphopenie und die damit verbundene homeostatische Proliferation gefördert wird (191). Die Eliminierung der noch residuellen Empfänger- B- und T-Zellen in diesen Tieren beruht in erster Linie auf der Alloreaktivität der Spender-Tconv-Zellen, dem zentralen Wirkprinzip der allogenen SZT und klinisch häufig als Spender-gegen-Hämatopoese-Effekt beschrieben (235, 236). Dies zeigte sich vor allem durch den Vergleich mit Tieren der KM-Gruppe, in denen sich auch zu späteren Zeitpunkten immer noch residuelle Empfänger-B- und T-Zellen Organen detektiert ließen.

Im Gegensatz zur Eliminierung der Empfänger-Lymphozyten kann das Verschwinden der mittransplantierten B-Zellen bzw. das Ausbleiben neu rekonstituierter Spender-B-Zellen in den Tieren mit GVHD nicht durch den Spender-versus-Hämatopoese-Effekt der Tconv-Zellen erklärt werden, da Ziel- und Effektorzelle in diesem Fall autolog zueinander sind. In zusätzlichen Experimenten sollten Aufschlüsse über mögliche Mediatoren und molekulare Mechanismen gewonnen werden, die für diesen Vorgang verantwortlich sein könnten. Als ersters sollte die unmittelbare Wirkung der beiden inflammatorischen Zytokine TNF und IFN- γ , die im Rahmen des „Zytokinsturms“ u.a. von alloreaktiven Spender-T-Zellen sezerniert werden, auf die im KM vorhandenen bzw. dort heranreifenden B-Zellen untersucht werden. Für eine aktive Rolle dieser Zytokine bei der Inhibition der B-Lymphopoese spricht die

Tatsache, dass Empfängertiere der Treg-Gruppe nicht nur vor einer GVHD geschützt waren und eine nahezu normale B-Zellrekonstitution aufwiesen, sondern dass sich in früheren Untersuchungen im Serum solcher Tiere auch signifikant erniedrigte IFN- γ - und TNF-Spiegel nachweisen ließen (100). Weitere Hinweise, dass diese im Rahmen einer Inflammation oftmals in großen Mengen sezernierten Zytokine direkt oder indirekt (z.B. über die Induktion von IL-1 in Makrophagen (194)) einen zytopathischen Effekt auf B-Zellen ausüben, gibt es darüber hinaus auch aus Transplantations-unabhängigen Tiermodellen (237, 238). Für den Fall eines direkten Effekts von IFN- γ und/oder TNF auf das sich rekonstituierende B-Zellkompartiment sollten hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen, die die jeweiligen Zytokinrezeptoren nicht auf ihrer Oberfläche tragen, von den negativen Auswirkungen verschont bleiben. Um dies zu untersuchen, wurden KM-Zellen aus C57BL/6 Wildtyp und Rezeptor-defizienten Tieren isoliert und jeweils im Verhältnis 1:1 zusammen mit Wildtyp Tconv Zellen transplantiert. In der Folge kam es jedoch in keinem der beiden Ansätze (WT/IFN- γ R^{-/-} und WT/TNFR1/2^{-/-} Kombination) zu einer selektiven Regeneration der B-Zellen aus dem jeweiligen „knock-out“- KM, sondern in beiden Fällen wurde eine vollständige Inhibition der B-Zellrekonstitution bei GVHD beobachtet. Interessanterweise zeigten Kontrolltiere, die nur das gemischte KM (ohne periphere T-Zellen) erhalten hatten, sehr wohl eine bevorzugte B-Zelldifferenzierung aus dem jeweiligen Rezeptor-defizienten KM-Anteil. Daraus lässt sich schließen, dass weder IFN- γ noch TNF alleine für die direkte Inhibition der B-Vorläuferzellen im KM verantwortlich sind, dass aber beide durchaus beteiligt sein könnten. Eine solche Beteiligung könnte auch indirekter Natur sein, z.B. durch die Induktion von Fas auf den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, gefolgt von einer Fas-FasL-vermittelten Apoptose der Zellen, wofür es Hinweise aus der Literatur gibt (196-198, 239).

Alternativ könnte, analog zu den Vorgängen im Thymus, die Modulation oder gar Zerstörung des KM-Stromas durch Zytokin-vermittelte inflammatorische Prozesse ursächlich sein. Für die frühe Entwicklung der B-Zellen im KM ist der Zell-Zell-Kontakt zwischen Vorläufer-B-Zellen und nicht-lymphoiden Stromazellen von entscheidender Bedeutung. Dieser wird einerseits über die Interaktion von Zelladhäsionsmolekülen (z.B. VLA-4/VCAM-1) aufrechterhalten (240, 241), andererseits aber auch durch die von den Stromazellen sezernierten Wachstumsfaktoren und Zytokine (z.B. SCF und IL-7) (242, 243). Darüber hinaus sind Chemokine wie SDF-1 (stromal cell-derived factor-1, CXCL12) vor allem für die Retention der Vorläuferzellen im KM verantwortlich (244-246). SDF-1 wird hauptsächlich von Osteoblasten im KM sezerniert (247) und bindet an den Chemokinrezeptor CXCR4 auf den Vorläuferzellen. Eine (experimentell induzierte) Defizienz an Osteoblasten, die neben SDF-1 auch noch andere Überlebensfaktoren für B-Zellen sezernieren, führt daher zu einem schnellen Verlust der B-Zelldifferenzierung und der Anzahl an B-Zellen im KM (248, 249). Sowohl für TNF als auch für IFN- γ konnte nachgewiesen werden, dass sie die Expression

von SDF-1 in Stromazellen inhibieren (250, 251). Dabei ist noch unklar, ob die Zytokine direkt oder indirekt auf die Stromazellen einwirken. Aufschluss hierüber könnten weiterführende Versuche geben, bei denen die oben erwähnten Rezeptor-defizienten Mäuse als Empfänger einer allogenen KMT eingesetzt werden. Da die Stromazellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs sind, werden sie nach der KMT auch nicht durch Spenderzellen ersetzt und bleiben so für die (direkte) Wirkung der jeweiligen Zytokine unempfindlich.

Die Abwesenheit von reifen und unreifen B- und T-Zellen, nicht aber von Monozyten/Makrophagen und Granulozyten im KM von Tieren mit GVHD legte die Vermutung nahe, dass durch die Erkrankung die Lymphopoese preferentiell betroffen ist und bereits frühe Vorläuferzellen im KM beeinträchtigt. Die Entwicklung der transplantierten hämatopoetischen Stammzellen des Spenders im Empfänger verläuft weitgehend gleich wie die physiologische Hämatopoese. Dabei entstehen im KM unreife B- und T-Zellen aus gemeinsamen Lymphozyten-Vorläuferzellen (CLP, common lymphocyte precursor). Während diese im Rahmen der GVHD direkt oder indirekt, z.B. über Veränderungen des Knochenmarkstromas, inhibiert oder sogar zerstört zu werden scheinen (präliminäre Daten nicht gezeigt), sind die myeloischen Vorläuferzellen (CMP, common myeloid precursor) davon offensichtlich nicht oder nur wenig betroffen (252). Whitlock und Witte entwickelten 1982 als erste ein *in vitro* Kultursystem, das es ermöglichte die Differenzierung von B-Zellen aus Vorläuferzellen unter Zuhilfenahme von KM-Stromazellen zu verfolgen und näher zu untersuchen (253). Seither wurden verschiedene Stromazelllinien, darunter auch die in dieser Arbeit eingesetzte ST-2 Zelllinie etabliert, die die Entwicklung reifer B-Zellen aus CLP und anderen frühen Vorläuferzellen *in vitro* unterstützen (254-257). ST-2 Zellen sezernieren jedoch nicht das für die B-Zellentwicklung essentielle Zytokin IL-7, das solchen Kulturen deshalb zugesetzt werden muss, sie unterstützen aber neben der B-Lymphopoese auch die Myelopoese aus Vorläuferzellen (257-260). Erwartungsgemäß entwickelten sich in Ko-Kulturen von ST-2 Zellen und KM-Zellen aus Tieren der KM-Gruppe sowohl B-Zellen als auch Monozyten. Im Gegensatz dazu konnten in entsprechenden Kulturen von KM-Zellen aus Tieren der GVHD-Gruppe nur Monozyten, nicht aber B-Zellen nachgewiesen werden. Dadurch wurde deutlich, dass es im Verlauf der GVHD tatsächlich zu einer Inhibition der Lymphopoese auf der Stufe der CLP kommt.

Weiter gestützt wurde diese Hypothese durch die KM-Retransplantationsversuche. Dabei stellte sich heraus, dass KM-Zellen aus Kontrolltieren (KM-Gruppe) nach Retransplantation in BALB/c Empfängermäuse zu einer wesentlich schnelleren Rekonstitution des B-Zellkompartiments in der Lage waren als KM-Zellen aus Tieren mit GVHD. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Brown und Mitarbeitern, die zeigten, dass durch die Zugabe von CLP zu hochreinen HSZ die Rekonstitution des lymphatischen

Systems deutlich beschleunigt wird (261), können somit auch diese Resultate als Hinweis auf eine Reduktion der CLP im KM von Tieren mit GVHD gewertet werden. Interessanterweise konnten die Autoren einer kürzlich veröffentlichten Studie dagegen keine Unterschiede hinsichtlich der Kinetik der B-Zellrekonstitution nach Retransplantation von KM-Zellen aus Tieren mit und ohne GVHD beobachten (262). Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten (Retransplantation an d 40 – d 50 nach KMT), wurden in besagter Studie die KM-Zellen allerdings schon wesentlich früher (d 14 nach KMT) aus den primären Empfängertieren reisoliert und retransplantiert. Dadurch könnten bei den beiden Versuchsreihen starke Unterschiede hinsichtlich des Schweregrads der KM-Schädigung durch die GVHD geherrscht haben.

Empfängertiere, die KM-Zellen aus Tieren mit GVHD erhalten hatten, wiesen neben einer deutlich verzögerten B-Zellrekonstitution auch eine erhöhte Sterberate auf. Diese beruhte in erster Linie auf einem Knochenmarkversagen, was sich durch das Auftreten einer Anämie bemerkbar machte. Somit ist wahrscheinlich, dass es in dem hier gewählten Modell durch die GVHD nicht nur zu einer Reduktion der lymphatischen Vorläuferzellen, sondern auch der HSZ selbst kam (263, 264). Dabei können, ähnlich wie bei den Vorläuferzellen, sowohl direkte als auch indirekte Effekte eine Rolle spielen. Solche Effekte wurden von der Arbeitsgruppe um Neil Young in einem experimentellen Mausmodell des infusionsinduzierten Knochenmarkversagens näher untersucht. In diesem Modell werden elterliche Lymphozyten (aus Lymphknoten isoliert und daher überwiegend T-Zellen) in subletal bestrahlte F1 Mäuse infundiert. In der Folge kommt es zu einer massiven Infiltration und Expansion der Spender T-Zellen im KM der Empfänger und zu einer schnellen Zerstörung von sowohl hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen (265), als auch von KM-Stromazellen (266). Da es sich hierbei um ein haploidentes Transplantationsmodell handelt (C57BL/6 → CB6F1), können sowohl Alloantigen-induzierte als auch inflammatorische Prozesse für die beobachteten Effekte verantwortlich sein. In Folgeexperimenten zeigte sich dann allerdings, dass es weder nach einer Retransplantation des geschädigten KM alleine, noch nach Retransplantation zusammen mit KM-Zellen aus unbehandelten, syngen C57BL/6 Mäusen in letal bestrahlten sekundären Empfängertieren zu einer Rekonstitution der Hämatopoese kommt. Dadurch wurde klar, dass die HSZ in diesem Modell nicht nur direkt von den ursprünglich infundierten T-Zellen angegriffen und zerstört werden (eine solche Reaktion wäre zumindest bei der Sekundärtransplantation aufgrund der syngen Herkunft von T-Zellen und HSZ ausgeschlossen), sondern dass ihre Eliminierung auch indirekt, durch die Zerstörung des KM-Stromas und damit der HSZ Nische durch die T-Zellen hervorgerufen wird. (267). Dafür spricht auch, dass KM-Zellen aus solchen C57BL/6 → F1 transplantierten Mäusen (im Gegensatz zu KM Zellen aus unbehandelten F1 Mäusen) nicht nur für sich alleine unfähig waren, *in vitro* einen intakten Stromazellrasen zu bilden, sondern dass sie

dies auch in Ko-Kulturen mit KM-Zellen aus syngeneten, unbehandelten Tieren verhinderten. Da im Gegensatz zu den Versuchen von Young und Mitarbeitern in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Retransplantationsversuchen das KM vor der Reinfusion in sekundäre Empfängertiere T-Zell-depletiert wurde, können direkte, T-Zell-vermittelte Effekte in unserem Fall ausgeschlossen werden. Zusammenfassend erscheint daher eine zuvor induzierte Reduktion der Anzahl an HSZ als wahrscheinlichste Ursache des beobachteten Knochenmarkversagens nach Retransplantation von KM-Zellen aus Tieren mit GVHD.

Die Arbeitsgruppe um Mark und Warren Shlomchik konnte durch eine Reihe eleganter Experimente mit sog. Knochenmarkschimären (Mäuse, deren hämatopoetische Zellen sich aufgrund einer vorangegangenen KMT von den restlichen Körperzellen unterscheiden) nachweisen, dass langlebige, strahlungsresistente APC des Empfängers an der Entwicklung einer T-Zell-vermittelten GVHD maßgeblich beteiligt sind (77). Ihre initiale Aktivierung, die auch einhergeht mit einer Hochregulation von MHC Klasse I und Klasse II Antigenen, erfolgt dabei durch die während der Konditionierung frei werdenden proinflammatorischen Zytokine. In der Regel werden im Rahmen einer KMT in diese proinflammatorische Situation hinein auch alloreaktive T-Zellen des Spenders infundiert, die ihrerseits durch die APC aktiviert werden und dadurch zu der Ausbildung des gefürchteten Zytokinsturms beitragen, d.h. einer deregulierten weiteren Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Werden Spender-T-Zellen dagegen erst zu einem späteren Zeitpunkt, im Rahmen einer sogenannten Spender-Lymphozyten-Infusion (*donor lymphocyte infusion*, DLI) transferiert, so ist durch den in der Zwischenzeit fast vollständig vollzogenen Austausch der residuellen Empfänger- durch Spender-APC und die bereits wieder abgeklungene konditionierungsinduzierte Inflammation die Gefahr der Entstehung eines „Zytokinsturms“ und der Entwicklung einer GVHD wesentlich geringer (268). Da die T-Zellen aber auch zu diesem Zeitpunkt immer noch in der Lage sind, den ebenfalls überwiegend auf ihrer Alloreaktivität beruhenden GVL-Effekt zu vermitteln, wird die DLI in der Klinik häufig zur Behandlung von bereits transplantierten Patienten nach Wiederauftreten ihrer malignen Erkrankung eingesetzt. Nach einem CML (Chronische myeloische Leukämie) Rückfall liegen die Erfolgchancen durch eine nachträgliche DLI bei ca. 80 % (269, 270). Allerdings kann es auch nach einer DLI noch zur Induktion einer schweren GVHD kommen (270), wobei dies stark von der Anzahl der übertragenen Zellen sowie vom gewählten Zeitpunkt nach KMT abhängig ist. Interessanterweise kann man in MHC-identen und MHC-haploidenten murinen Transplantationsmodellen nach einer verzögerten Infusion von Spender-Milzzellen (zwischen Tag 7 und Tag 21 nach letaler Bestrahlung und KMT) so gut wie keine GVHD mehr induzieren (271, 272), während dies in einem MHC-differenten Mausmodell immer noch gut möglich ist (273). Allerdings fällt auch hier die durch die DLI verursachte GVHD wesentlich geringer aus im Vergleich zur Induktion zum Zeitpunkt der KMT (273, 274).

Um zu untersuchen, wie sich eine DLI-induzierte GVHD auf die gleichzeitig ablaufende bzw. gerade abgeschlossene Immunrekonstitution des Empfängers nach allogener KMT auswirkt, wurden in der vorliegenden Arbeit Tieren der KM-Gruppe nachträglich titrierte Mengen an Spender-CD4⁺ Tconv-Zellen infundiert und die Auswirkungen auf das zu diesem Zeitpunkt bereits wieder regenerierte B-Zellkompartiment über mehrere Wochen verfolgt. In Abhängigkeit von der verabreichten T-Zelldosis kam es in den Tieren zur Entwicklung einer GVHD und zeitgleich zu einem raschen und signifikanten Rückgang der B-Zellpopulation im peripheren Blut. Dabei zeigte sich eine strikte Korrelation zwischen der Schwere der GVHD und dem Ausmaß der B-Zell-Reduktion. Das B-Zellkompartiment erholte sich im Verlauf der folgenden Wochen zwar wieder, erreichte aber auch 4 Wochen nach DLI noch nicht wieder die Werte unbehandelter Tiere aus der KM-Gruppe. Ähnliche Resultate wurden auch von Johnson und Kollegen berichtet, die in den von ihnen durchgeführten Studien in einem MHC-differenten Modell nach einer DLI eine signifikant erniedrigte Gesamtmilzzellzahl mit einem reduzierten relativen Anteil an B-Lymphozyten beobachteten (273). Interessanterweise kam es bei meinen Versuchen gleichzeitig zum Umschlag des bis dahin noch gemischten in einen vollständigen Donor-T-Zell-Chimerismus sowie zu einem Block im Anstieg der sich aus dem KM entwickelnden T-Zellpopulation. Dies deutet zum Einen darauf hin, dass es in dem gewählten Modell auch drei Wochen nach KMT durch die transferierten T-Zellen noch zu einem ausgeprägten 'Spender-gegen-Hämatopoese-Effekt' kommt (Chimerismuswechsel).

Andererseits beweisen diese Daten eindeutig, dass die Lymphopenie bei GVHD nicht alleine durch die Alloreaktivität von Spender-T-Zellen zu erklären ist, da eine DLI-induzierte GVHD auch zur Suppression der bereits aus dem KM rekonstituierten B- und T-Zellen führt. Da die GVHD-induzierten T-Zellen zu diesem Zeitpunkt MHC-ident sind zu den supprimierenden Lymphozytenpopulationen, kann dies nur bedeuten, dass die ursprünglich durch Alloantigene induzierte Inflammation entweder über Zytokine direkt zur Beeinträchtigung der lymphatischen Vorläuferzellen führt oder dass die durch Alloreaktion freigesetzten Zytokine indirekt das KM-Stroma derart beeinträchtigen, dass die normale Rekonstitution der Lymphopoese beeinträchtigt wird. Als dritte Möglichkeit könnten CD4⁺ T-Zellen auch eine zytotoxische Wirkung auf das KM-Stroma ausüben, allerdings wurden solche Effekte bisher von MHC Klasse II-restringierten CD4⁺ T-Zellen nicht beobachtet. Die Aufklärung dieser möglicher Ursachen ist Ziel derzeit geplanter Experimente.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die allogene Stammzelltransplantation ist ein etabliertes Verfahren zur Behandlung von malignen und einigen nicht-malignen Erkrankungen der Hämatopoese. Zur Minimierung immunologischer Komplikationen wird in der Regel zwischen HLA (Human leucocyte antigen)-identischen Spendern und Empfängern transplantiert, da mit steigender HLA-Disparität das Risiko für das Auftreten einer Spender-gegen-Empfängerreaktion (graft-versus-host disease, GVHD) steigt. Trotzdem kommt es auch nach HLA-identischer Transplantation häufig zur GVHD, die in dieser Konstellation durch Minor-Histokompatibilitätsantigene ausgelöst wird. Klinisch wird nach allogener Stammzelltransplantation eine verzögerte Rekonstitution des adaptiven Immunsystems beobachtet, wofür hauptsächlich die zur GVHD-Prophylaxe eingesetzte Immunsuppression verantwortlich gemacht wird. Diese prolongierte Immundefizienz erhöht das Risiko für opportunistische Infektionen, die oftmals zum Tod der Patienten führen. Zentrales Ziel der aktuellen Transplantationsforschung ist es deshalb, Strategien zu identifizieren, die zur Verbesserung der Immunrekonstitution führen ohne das Risiko für die Auslösung einer GVHD zu erhöhen.

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese war, dass nicht nur die pharmakologische Immunsuppression zur verzögerten Immunrekonstitution beiträgt, sondern insbesondere die schwere GVH-Reaktion. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde ein MHC (Major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex) -differentes Mausmodell ohne pharmakologische Immunsuppression eingesetzt und die B-Zell-Rekonstitution nach allogener KMT (Knochenmarktransplantation) in Tieren mit und ohne GVHD untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es in Tieren mit schwerer GVHD (nach Transplantation von Knochenmark (KM) und T-Zellen) zu keiner Rekonstitution des B-Zell-Kompartiments kam, während Tiere ohne GVHD (Transplantation von KM ohne T-Zellen) eine rasche und vollständige Rekonstitution der Spender-B-Zellen zeigten. Histologisch und mittels durchflusszytometrischer Messmethode wurde nachgewiesen, dass die GVHD zur Zerstörung peripherer Lymphorgane führte. Diese schien aber nicht alleine für die B-Zell-Defizienz verantwortlich zu sein, da sich in Knochenmarkanalysen herausstellte, dass die B-Zell-Rekonstitution bei GVHD bereits auf der Stufe von B-Vorläuferzellen im KM gestört war. Darüber hinaus zeigte sich auch ein Einfluss auf Vorläuferzellen der T-Zell-Reihe, so dass zu vermuten war, dass vor allem gemeinsame Vorläuferzellen (common lymphoid precursor, CLP) beeinträchtigt wurden, während die Myelopoese nur unwesentlich betroffen war. Diese Störungen in der B- und T-Zell-Entwicklung in GVHD-Tieren konnte bereits zu sehr frühen

Zeitpunkten (innerhalb von 7 Tagen) nach Transplantation detektiert werden. Um zu beweisen, dass inflammatorische Prozesse im Rahmen der GVHD die B-Lymphopoese inhibierten und nicht lediglich das Anwachsen von Vorläuferzellen beeinträchtigt wurde, wurde die Erkrankung in separaten Experimenten erst nach Rekonstitution der Spenderlymphopoese an Tag 21 nach KMT durch die nachträgliche Infusion von Spender-T-Zellen induziert. Auch in diesem Modell kam es dosisabhängig zu einer Suppression der B-Zellen, so dass bestätigt wurde, dass GVHD-induzierende T-Zellen zu inflammatorischen Reaktionen führten, die selbst bereits rekonstituierte B-Zellen (HLA-identisch zu den GVHD-induzierenden T-Zellen) eliminierten.

In früheren Publikationen der Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass der adoptive Transfer von $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Forkhead box P3, Transkriptionsfaktor) natürlichen regulatorischen T-Zellen (Treg Zellen) des Spenders im Mausmodell vor akuter GVHD schützt. Deshalb wurde zusätzlich untersucht, wie sich der Transfer dieser immunsuppressiven T-Zell-Population auf die B-Zell-Rekonstitution auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Art der immunologischen Immunsuppression nicht zur Paralyse des Immunsystems führte, sondern dass die GVHD-induzierte Zerstörung der Lymphorgane verhindert und die Rekonstitution der lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark gefördert wurde. In der Summe ergab sich hierdurch nicht eine schlechtere, sondern im Gegenteil, eine verbesserte Immunrekonstitution nach allogener KMT.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde versucht, die Mechanismen der gestörten Immunrekonstitution bei GVHD aufzuklären. Aus publizierten Arbeiten war bekannt, dass die Zytokine $IFN-\gamma$ (Interferon- γ) und TNF (Tumor necrosis factor, Tumornekrosefaktor) die B-Lymphopoese beeinträchtigen können und dass diese Zytokine bei akuter GVHD vermehrt sezerniert werden. Es wurde deshalb untersucht, ob sie bei GVHD direkt auf lymphatische Vorläuferzellen im KM einwirken. Hierfür wurde KM von Wildtyp-Tieren und von $IFN-\gamma$ - bzw. TNF-Rezeptor-defizienten Spendern kotransplantiert und anschließend untersucht, ob die B-Lymphopoese in GVHD-Tieren selektiv aus dem Rezeptor-defizienten Mark regeneriert. Eine selektive Regeneration der B-Zellen wurde jedoch weder aus $IFN-\gamma$ - noch aus TNF-Rezeptor-defizientem KM beobachtet, so dass keines dieser Zytokine alleine für die B-Zell-Defizienz bei GVHD verantwortlich zu sein schien.

Da Zytokine nicht nur direkt auf die Vorläuferzellen im KM wirken könnten sondern auch indirekt über die Zerstörung der B-Zell-Nische (bzw. CLP-Nische), wurden anschließend Retransplantationsstudien durchgeführt. Hierfür wurde KM aus Tieren mit GVHD isoliert, T-Zell-depletiert und erneut in letal bestrahlte Empfänger transplantiert. Es zeigte sich in diesen Tieren, dass Stammzellen aus GVHD-Tieren in GVHD-freien Empfängern der 2. Generation die B-Lymphopoese prinzipiell rekonstituieren konnten. Die leicht verzögerte Immunrekonstitution in diesen Empfängern im Vergleich zu Empfängern von KM aus

unbehandelten Spendern wies darauf hin, dass das KM von GVHD-Tieren geringere Mengen an determinierten Vorläuferzellen enthielt. Durch Verwendung von Stromazellkulturen, die eine Entwicklung von B-Zell-Kolonien unterstützen, konnte die Defizienz von CLP im Knochenmark von Tieren mit GVHD *in vitro* bestätigt werden.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollen in zukünftigen Experimenten mittels Vielfarben-Durchflußzytometrie die derzeit bekannten Stadien der lymphatischen Vorläuferzellen im KM von GVHD-Tieren exakt quantifiziert werden, um die Stufe des Entwicklungsblocks genau zu definieren. Da auch ein Defekt in der T-Zell-Rekonstitution von GVHD Tieren gezeigt werden konnte, wird erwartet, dass primär die CLP betroffen sind. Darüber hinaus sollte in Folgeversuchen untersucht werden, wie ko-transplantierte Spender-Treg-Zellen die frühe Rekonstitution der lymphatischen Vorläufer im KM fördern. Vor allem sollte aber untersucht werden, ob die Graft-versus-Leukämiewirkung bei B-Zell-Malignomen nicht zumindest teilweise auf solche B-Zell-toxischen Wirkungen der GVHD-induzierten Inflammation zurückzuführen ist, da bisher angenommen wird, dass Transplantat-gegen-Leukämie-Effekte (Graft-versus-leukemia, GVL) ausschließlich auf der Erkennung von Alloantigenen durch Spender-T-Zellen auf hämatopoetischen Empfängerzellen beruhen.

6 Summary

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (SCT) is a well-established treatment modality for malignant and some non-malignant hematologic diseases. To minimize immunological complication, transplantation between HLA-identical donor and recipient are generally preferred, because HLA disparity is a major risk factor for transplant-related complications such as graft rejection and graft versus host disease (GVHD). However, GVHD may even occur when donor and recipient have identical HLA alleles, due to differences in their minor histocompatibility antigens. Impaired immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation (BMT), which is usually attributed to the required immunosuppressive therapy, moved to the forefront of clinical problems limiting progress in allogeneic SCT, not only because an immune defect is related to infectious morbidity post transplant. The aim of current studies in transplantation research is to improve immune reconstitution while preventing GVHD.

The hypothesis underlying this work was that not only the pharmacological immunosuppression but notably the severity of GVHD may lead in turn to a delay in immune reconstitution. Using a murine completely major histocompatibility complex (MHC)-mismatched BMT model, without pharmacological immunosuppression we examined the influence of GVHD on B cell reconstitution after allogeneic BMT. We found, that animals with severe GVHD (BM plus conventional T cells) showed no reconstitution of their B cell compartment, whereas animals without GVHD (only BM) reconstituted donor B cells rapidly after transplantation. Histological examination and flow cytometric analysis of lymphocytes from GVHD animals revealed that the B cell deficiency was not only caused by the GVHD-induced destruction of secondary lymphoid organs, but also by a lack of B cell precursors in the BM. Beyond that we could also detect an effect of GVHD on T cell precursors suggesting that mainly common lymphoid progenitor (CLP) cells are affected, whereas myelopoiesis was only marginally involved. This defects in B and T cell development in animals with GVHD could be detected already early after BMT (within 7d). To demonstrate that indeed the inflammatory processes of GVHD impaired B lymphopoiesis and to exclude that solely failed engraftment of CLP was responsible for this impairment, we induced GVHD in recipients of MHC-disparate BM that had already reconstituted their B cell compartment (d21 post BMT). Although the GVHD-inducing donor T cells were syngeneic to the previous BM graft, B cells disappeared from the periphery as soon as GVHD was induced.

Hoffmann et al. showed that the co-transplantation of freshly isolated donor-derived natural CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Treg) prevent lethal GVHD after allogeneic BMT in experimental models. Therefore we analyzed whether their suppressive effect enhances or inhibits immune reconstitution after allogeneic BMT and examined the recovery rate of the

peripheral B cell compartment after BMT. The immunosuppressive effect of T cells did not cause immune system paralysis, but avoided GVHD-induced destruction of lymphoid organs and even promoted the reconstitution of lymphoid progenitor cells in BM. In summary we could show that protection from GVHD by Treg cells rather fosters than hampers immune recovery after allogeneic BMT.

In the second part of the present thesis, we tried to identify the mechanism that is involved in the impaired immune reconstitution during the course of GVHD. It was known that IFN- γ (Interferon- γ) and TNF (Tumor necrosis factor) are able to impair B lymphopoiesis and that elevated levels of these cytokines are secreted during GVHD.

To examine their influence on lymphoid progenitor cells in bone marrow we co-transplanted BM from wildtype (wt) and IFN- γ - or TNF-receptor-deficient mice. so we can determine whether B lymphopoiesis reconstituted selective from the receptor-deficient BM. These experiments showed no preferential B cell reconstitution neither from the IFN- γ nor from the TNF-receptor-deficient BM leading to the assumption that none of these cytokines seems to impair B cell reconstitution during GVHD on its own.

As pro-inflammatory cytokines secreted during GVHD not only impair B lymphopoiesis directly but also indirectly, e.g. through destructure of the BM microenvironment we performed retransplantation-experiments. For this purpose BM from animals with GVHD was isolated and serially transplanted in secondary lethally irradiated recipients (without donor T cells). In this model, stem cells from animals with GVHD were still capable to reconstitute B lymphopoiesis in recipients without GVHD. The delayed and slightly reduced immune reconstitution in this recipients, in comparison with mice that received BM from untreated donors, indicated that BM isolated from mice with GVHD comprises less determined progenitor cells. The lack of CLP in the bone marrow from GVHD stressed animals was validated *in vitro* by means of experiments with stroma cell cultures which supported the development of B cell colonies.

Based on these results, the currently known stages of lymphoid progenitor cells in bone marrow from GVHD animals should be quantified by multicolor flow cytometry in order to exactly identify the point when development is blocked. Since a defect in T cell reconstitution was detected, we expecte that mainly CLP are affected. Further experiments should clarify how co-transplanted donor Treg cells promote the reconstitution of early lymphoid progenitor cells in the bone marrow.

Up to now graft-versus-leukemia effects are believed to be exclusively based on alloantigenic recognition by T cells that are presented on the hematopoietic cells of recipients. However, studies analyzing whether the described toxic effects on B cells by GVHD-induced inflammation could be at least partially attributed to the GVL effects on B cell lymphomas should be done.

7 Literaturverzeichnis

1. Abbas, A.K., and C.A. Janeway, Jr. 2000. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* 100:129-138.
2. Janeway, C.A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
3. Delves, P.J., and I.M. Roitt. 2000. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:37-49.
4. Delves, P.J., and I.M. Roitt. 2000. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343:108-117.
5. Germain, R.N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287-299.
6. Swain, S.L. 1983. T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol Rev* 74:129-142.
7. Okada, T., and J.G. Cyster. 2006. B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. *Curr Opin Immunol* 18:278-285.
8. Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-173.
9. Armitage, R.J., W.C. Fanslow, L. Strockbine, T.A. Sato, K.N. Clifford, B.M. Macduff, D.M. Anderson, S.D. Gimpel, T. Davis-Smith, C.R. Maliszewski, and et al. 1992. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357:80-82.
10. Bishop, G.A., S.A. Haxhinasto, L.L. Stunz, and B.S. Hostager. 2003. Antigen-specific B-lymphocyte activation. *Crit Rev Immunol* 23:149-197.
11. Lumsden, J.M., J.A. Williams, and R.J. Hodes. 2003. Differential requirements for expression of CD80/86 and CD40 on B cells for T-dependent antibody responses in vivo. *J Immunol* 170:781-787.

12. von Bergwelt-Baildon, M.S., R.H. Vonderheide, B. Maecker, N. Hirano, K.S. Anderson, M.O. Butler, Z. Xia, W.Y. Zeng, K.W. Wucherpfennig, L.M. Nadler, and J.L. Schultze. 2002. Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application. *Blood* 99:3319-3325.
13. Bennett, S.R., F.R. Carbone, T. Toy, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1998. B cells directly tolerize CD8(+) T cells. *J Exp Med* 188:1977-1983.
14. Hollsberg, P., V. Batra, A. Dressel, and D.A. Hafler. 1996. Induction of anergy in CD8 T cells by B cell presentation of antigen. *J Immunol* 157:5269-5276.
15. Parekh, V.V., D.V. Prasad, P.P. Banerjee, B.N. Joshi, A. Kumar, and G.C. Mishra. 2003. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *J Immunol* 170:5897-5911.
16. Mauri, C., and M.R. Ehrenstein. 2008. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol* 29:34-40.
17. Schofield, R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4:7-25.
18. Lai, A.Y., and M. Kondo. 2008. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin Immunol* 20:207-212.
19. Molnar, A., and K. Georgopoulos. 1994. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 14:8292-8303.
20. Scott, E.W., M.C. Simon, J. Anastasi, and H. Singh. 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265:1573-1577.
21. Bain, G., E.C. Maandag, D.J. Izon, D. Amsen, A.M. Kruisbeek, B.C. Weintraub, I. Krop, M.S. Schlissel, A.J. Feeney, M. van Roon, and et al. 1994. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79:885-892.
22. Zhuang, Y., P. Soriano, and H. Weintraub. 1994. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 79:875-884.

23. Nutt, S.L., C. Thevenin, and M. Busslinger. 1997. Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology* 198:227-235.
24. Peschon, J.J., P.J. Morrissey, K.H. Grabstein, F.J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B.C. Gliniak, L.S. Park, S.F. Ziegler, D.E. Williams, C.B. Ware, J.D. Meyer, and B.L. Davison. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180:1955-1960.
25. Mackarechtschian, K., J.D. Hardin, K.A. Moore, S. Boast, S.P. Goff, and I.R. Lemischka. 1995. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 3:147-161.
26. Barbizet, J., J.D. Degos, A. Lejeune, and A. Leroy. 1978. [Interhemispheric disconnection syndrome with diagnostic dyspraxia in the course of Marchiafava-Bignami disease]. *Rev Neurol (Paris)* 134:781-789.
27. Adolfsson, J., O.J. Borge, D. Bryder, K. Theilgaard-Monch, I. Astrand-Grundstrom, E. Sitnicka, Y. Sasaki, and S.E. Jacobsen. 2001. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15:659-669.
28. DeKoter, R.P., H.J. Lee, and H. Singh. 2002. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* 16:297-309.
29. Rolink, A., and F. Melchers. 1993. B lymphopoiesis in the mouse. *Adv Immunol* 53:123-156.
30. Osmond, D.G., A. Rolink, and F. Melchers. 1998. Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol Today* 19:65-68.
31. Carsetti, R. 2000. The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *J Exp Med* 191:5-8.
32. Rolink, A., and F. Melchers. 1996. B-cell development in the mouse. *Immunol Lett* 54:157-161.
33. Chen, J., and F.W. Alt. 1993. Gene rearrangement and B-cell development. *Curr Opin Immunol* 5:194-200.
34. Sekiguchi, J., and K. Frank. 1999. V(D)J recombination. *Curr Biol* 9:R835.

35. Grawunder, U., T.M. Leu, D.G. Schatz, A. Werner, A.G. Rolink, F. Melchers, and T.H. Winkler. 1995. Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* 3:601-608.
36. Vettermann, C., K. Herrmann, and H.M. Jack. 2006. Powered by pairing: the surrogate light chain amplifies immunoglobulin heavy chain signaling and pre-selects the antibody repertoire. *Semin Immunol* 18:44-55.
37. Engel, H., A. Rolink, and S. Weiss. 1999. B cells are programmed to activate kappa and lambda for rearrangement at consecutive developmental stages. *Eur J Immunol* 29:2167-2176.
38. van der Burg, M., T. Tumkaya, M. Boerma, S. de Bruin-Versteeg, A.W. Langerak, and J.J. van Dongen. 2001. Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the IGK locus but seems less strict at the IGL locus. *Blood* 97:1001-1008.
39. Mayumi, M., Y. Ohshima, D. Hata, K.M. Kim, T. Heike, K. Katamura, and K. Furusho. 1995. IgM-mediated B cell apoptosis. *Crit Rev Immunol* 15:255-269.
40. Benschop, R.J., and J.C. Cambier. 1999. B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Curr Opin Immunol* 11:143-151.
41. Cambier, J.C., S.B. Gault, K.T. Merrell, and B.J. Vilen. 2007. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol* 7:633-643.
42. Allman, D.M., S.E. Ferguson, V.M. Lentz, and M.P. Cancro. 1993. Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol* 151:4431-4444.
43. Rolink, A.G., J. Andersson, and F. Melchers. 1998. Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *Eur J Immunol* 28:3738-3748.
44. Loder, F., B. Mutschler, R.J. Ray, C.J. Paige, P. Sideras, R. Torres, M.C. Lamers, and R. Carsetti. 1999. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* 190:75-89.

45. Chung, J.B., M. Silverman, and J.G. Monroe. 2003. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol* 24:343-349.
46. Couban, S., and M. Barnett. 2003. The source of cells for allografting. *Biol Blood Marrow Transplant* 9:669-673.
47. Olavarria, E., and E.J. Kanfer. 2000. Selection and use of chemotherapy with hematopoietic growth factors for mobilization of peripheral blood progenitor cells. *Curr Opin Hematol* 7:191-196.
48. Tarella, C., G. Benedetti, D. Caracciolo, C. Castellino, C. Cherasco, P. Bondesan, P. Omede, D. Ruggieri, A.M. Gianni, and A. Pileri. 1995. Both early and committed haemopoietic progenitors are more frequent in peripheral blood than in bone marrow during mobilization induced by high-dose chemotherapy + G-CSF. *Br J Haematol* 91:535-543.
49. Gluckman, E., V. Rocha, A. Boyer-Chammard, F. Locatelli, W. Arcese, R. Pasquini, J. Ortega, G. Souillet, E. Ferreira, J.P. Laporte, M. Fernandez, and C. Chastang. 1997. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 337:373-381.
50. Kurtzberg, J., M. Laughlin, M.L. Graham, C. Smith, J.F. Olson, E.C. Halperin, G. Ciocchi, C. Carrier, C.E. Stevens, and P. Rubinstein. 1996. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 335:157-166.
51. Rocha, V., J.E. Wagner, Jr., K.A. Sobocinski, J.P. Klein, M.J. Zhang, M.M. Horowitz, and E. Gluckman. 2000. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med* 342:1846-1854.
52. Rubinstein, P., and C.E. Stevens. 2000. Placental blood for bone marrow replacement: the New York Blood Center's program and clinical results. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13:565-584.
53. Ooi, J., T. Iseki, S. Takahashi, A. Tomonari, K. Takasugi, M. Uchiyama, T. Konuma, M. Futami, A. Nomura, S. Nakayama, Y. Soda, N. Ohno, F. Nagamura, K. Uchimarui, A. Tojo, K. Tani, and S. Asano. 2004. Unrelated cord blood transplantation after

- myeloablative conditioning in patients over the age of 45 years. *Br J Haematol* 126:711-714.
54. Laughlin, M.J., J. Barker, B. Bambach, O.N. Koc, D.A. Rizzieri, J.E. Wagner, S.L. Gerson, H.M. Lazarus, M. Cairo, C.E. Stevens, P. Rubinstein, and J. Kurtzberg. 2001. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 344:1815-1822.
55. Sanz, G.F., S. Saavedra, D. Planelles, L. Senent, J. Cervera, E. Barragan, C. Jimenez, L. Larrea, G. Martin, J. Martinez, I. Jarque, F. Moscardo, G. Plume, R. Andreu, A.I. Regadera, I. Garcia, S. Molla, P. Solves, J. de La Rubia, P. Bolufer, L. Benlloch, M.A. Soler, M.L. Marty, and M.A. Sanz. 2001. Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies. *Blood* 98:2332-2338.
56. Petersdorf, E.W. 2006. Immunogenomics of unrelated hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol* 18:559-564.
57. Petersdorf, E.W. 2007. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: histocompatibility. *Best Pract Res Clin Haematol* 20:155-170.
58. Archbold, J.K., L.K. Ely, L. Kjer-Nielsen, S.R. Burrows, J. Rossjohn, J. McCluskey, and W.A. Macdonald. 2008. T cell allorecognition and MHC restriction--A case of Jekyll and Hyde? *Mol Immunol* 45:583-598.
59. den Haan, J.M., N.E. Sherman, E. Blokland, E. Huczko, F. Koning, J.W. Drijfhout, J. Skipper, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, V.H. Engelhard, and et al. 1995. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 268:1476-1480.
60. Welniak, L.A., B.R. Blazar, and W.J. Murphy. 2007. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 25:139-170.
61. Ho, V.T., and R.J. Soiffer. 2001. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 98:3192-3204.
62. Couriel, D., J. Canosa, H. Engler, A. Collins, C. Dunbar, and A.J. Barrett. 1996. Early reactivation of cytomegalovirus and high risk of interstitial pneumonitis following T-depleted BMT for adults with hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 18:347-353.

63. Georges, G.E., and R. Storb. 2003. Review of "minitransplantation": nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 77:3-14.
64. June, C.H. 2007. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest* 117:1466-1476.
65. Martin, P.J., G. Schoch, L. Fisher, V. Byers, C. Anasetti, F.R. Appelbaum, P.G. Beatty, K. Doney, G.B. McDonald, J.E. Sanders, and et al. 1990. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 76:1464-1472.
66. Sullivan, K.M., E. Agura, C. Anasetti, F. Appelbaum, C. Badger, S. Bearman, K. Erickson, M. Flowers, J. Hansen, T. Loughran, and et al. 1991. Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin Hematol* 28:250-259.
67. Sullivan, K.M., M. Mori, J. Sanders, M. Siadak, R.P. Witherspoon, C. Anasetti, F.R. Appelbaum, W. Bensinger, R. Bowden, C.D. Buckner, and et al. 1992. Late complications of allogeneic and autologous marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 10 Suppl 1:127-134.
68. Billingham, R.E. 1966. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 62:21-78.
69. Ferrara, J.L., J.E. Levine, P. Reddy, and E. Holler. 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet* 373:1550-1561.
70. Vogelsang, G.B., L. Lee, and D.M. Bensen-Kennedy. 2003. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* 54:29-52.
71. Ferrara, J.L., K.R. Cooke, L. Pan, and W. Krenger. 1996. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells* 14:473-489.
72. Antin, J.H., and J.L. Ferrara. 1992. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 80:2964-2968.
73. Ferrara, J.L., K.R. Cooke, and T. Teshima. 2003. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 78:181-187.

74. Krenger, W., G.R. Hill, and J.L. Ferrara. 1997. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 64:553-558.
75. Hill, G.R., and J.L. Ferrara. 2000. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95:2754-2759.
76. Hill, G.R., J.M. Crawford, K.R. Cooke, Y.S. Brinson, L. Pan, and J.L. Ferrara. 1997. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 90:3204-3213.
77. Shlomchik, W.D., M.S. Couzens, C.B. Tang, J. McNiff, M.E. Robert, J. Liu, M.J. Shlomchik, and S.G. Emerson. 1999. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285:412-415.
78. Shlomchik, W.D. 2003. Antigen presentation in graft-vs-host disease. *Exp Hematol* 31:1187-1197.
79. Lechler, R., W.F. Ng, and R.M. Steinman. 2001. Dendritic cells in transplantation--friend or foe? *Immunity* 14:357-368.
80. Korngold, R., and J. Sprent. 1980. Negative selection of T cells causing lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. Role of the H-2 complex. *J Exp Med* 151:1114-1124.
81. Beilhack, A., S. Schulz, J. Baker, G.F. Beilhack, C.B. Wieland, E.I. Herman, E.M. Baker, Y.A. Cao, C.H. Contag, and R.S. Negrin. 2005. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood* 106:1113-1122.
82. Hornick, P., and R. Lechler. 1997. Direct and indirect pathways of alloantigen recognition: relevance to acute and chronic allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant* 12:1806-1810.
83. Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18:593-620.
84. van den Brink, M.R., and S.J. Burakoff. 2002. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2:273-281.
85. Kahan, B.D. 1989. Cyclosporine. *N Engl J Med* 321:1725-1738.

86. Jolivet, J., K.H. Cowan, G.A. Curt, N.J. Clendeninn, and B.A. Chabner. 1983. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 309:1094-1104.
87. Hill, G.R., W. Krenger, and J.L. Ferrara. 1997. The role of cytokines in acute graft-versus-host disease. *Cytokines Cell Mol Ther* 3:257-266.
88. Hill, G.R., T. Teshima, A. Gerbitz, L. Pan, K.R. Cooke, Y.S. Brinson, J.M. Crawford, and J.L. Ferrara. 1999. Differential roles of IL-1 and TNF-alpha on graft-versus-host disease and graft versus leukemia. *J Clin Invest* 104:459-467.
89. Baron, F., J.E. Baker, R. Storb, T.A. Gooley, B.M. Sandmaier, M.B. Maris, D.G. Maloney, S. Heimfeld, D. Oparin, E. Zellmer, J.P. Radich, F.C. Grumet, K.G. Blume, T.R. Chauncey, and M.T. Little. 2004. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 104:2254-2262.
90. Perez-Simon, J.A., M. Diez-Campelo, R. Martino, S. Brunet, A. Urbano, M.D. Caballero, A. de Leon, D. Valcarcel, E. Carreras, M.C. del Canizo, J. Lopez-Fidalgo, J. Sierra, and J.F. San Miguel. 2005. Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 130:394-403.
91. Marmont, A.M., M.M. Horowitz, R.P. Gale, K. Sobocinski, R.C. Ash, D.W. van Bekkum, R.E. Champlin, K.A. Dicke, J.M. Goldman, R.A. Good, and et al. 1991. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 78:2120-2130.
92. Maraninchi, D., E. Gluckman, D. Blaise, D. Guyotat, B. Rio, J.L. Pico, V. Leblond, M. Michallet, F. Dreyfus, N. Ifrah, and et al. 1987. Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet* 2:175-178.
93. Keever, C.A., T.N. Small, N. Flomenberg, G. Heller, K. Pekle, P. Black, A. Pecora, A. Gillio, N.A. Kernan, and R.J. O'Reilly. 1989. Immune reconstitution following bone marrow transplantation: comparison of recipients of T-cell depleted marrow with recipients of conventional marrow grafts. *Blood* 73:1340-1350.
94. Holler, E., H.J. Kolb, G. Eissner, and W. Wilmanns. 1998. Cytokines in GvH and GvL. *Bone Marrow Transplant* 22 Suppl 4:S3-6.

95. Speiser, D.E., M.F. Bachmann, T.W. Frick, K. McKall-Faienza, E. Griffiths, K. Pfeffer, T.W. Mak, and P.S. Ohashi. 1997. TNF receptor p55 controls early acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 158:5185-5190.
96. Blazar, B.R., A.H. Sharpe, P.A. Taylor, A. Panoskaltsis-Mortari, G.S. Gray, R. Korngold, and D.A. Valleria. 1996. Infusion of anti-B7.1 (CD80) and anti-B7.2 (CD86) monoclonal antibodies inhibits murine graft-versus-host disease lethality in part via direct effects on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 157:3250-3259.
97. Lenschow, D.J., Y. Zeng, J.R. Thistlethwaite, A. Montag, W. Brady, M.G. Gibson, P.S. Linsley, and J.A. Bluestone. 1992. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 257:789-792.
98. Le Blanc, K., F. Frassoni, L. Ball, F. Locatelli, H. Roelofs, I. Lewis, E. Lanino, B. Sundberg, M.E. Bernardo, M. Remberger, G. Dini, R.M. Egeler, A. Bacigalupo, W. Fibbe, and O. Ringden. 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371:1579-1586.
99. Gatz, E., C.E. Rogers, S.G. Clouthier, K.P. Lowler, I. Tawara, C. Liu, P. Reddy, and J.L. Ferrara. 2008. Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. *Blood* 112:1515-1521.
100. Edinger, M., P. Hoffmann, J. Ermann, K. Drago, C.G. Fathman, S. Strober, and R.S. Negrin. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 9:1144-1150.
101. Ermann, J., P. Hoffmann, M. Edinger, S. Dutt, F.G. Blankenberg, J.P. Higgins, R.S. Negrin, C.G. Fathman, and S. Strober. 2005. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 105:2220-2226.
102. Hoffmann, P., J. Ermann, M. Edinger, C.G. Fathman, and S. Strober. 2002. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 196:389-399.
103. Storek, J. 2008. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation - its relation to the contents of the graft. *Expert Opin Biol Ther* 8:583-597.

104. Neven, B., S. Leroy, H. Decaluwe, F. Le Deist, C. Picard, D. Moshous, N. Mahlaoui, M. Debre, J.L. Casanova, L. Dal Cortivo, Y. Madec, S. Hacein-Bey-Abina, G. de Saint Basile, J.P. de Villartay, S. Blanche, M. Cavazzana-Calvo, and A. Fischer. 2009. Long-term outcome after hematopoietic stem cell transplantation of a single-center cohort of 90 patients with severe combined immunodeficiency. *Blood* 113:4114-4124.
105. Mackall, C.L., and R.E. Gress. 1997. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol Rev* 157:61-72.
106. Mackall, C.L., L. Granger, M.A. Sheard, R. Cepeda, and R.E. Gress. 1993. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* 82:2585-2594.
107. Tanchot, C., and B. Rocha. 1995. The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8+ T cell pools. *Eur J Immunol* 25:2127-2136.
108. Mackall, C.L., C.V. Bare, L.A. Granger, S.O. Sharrow, J.A. Titus, and R.E. Gress. 1996. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol* 156:4609-4616.
109. Roux, E., C. Helg, F. Dumont-Girard, B. Chapuis, M. Jeannet, and E. Roosnek. 1996. Analysis of T-cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: significant differences between recipients of T-cell depleted and unmanipulated grafts. *Blood* 87:3984-3992.
110. Douek, D.C., R.A. Vescio, M.R. Betts, J.M. Brenchley, B.J. Hill, L. Zhang, J.R. Berenson, R.H. Collins, and R.A. Koup. 2000. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 355:1875-1881.
111. Weinberg, K., B.R. Blazar, J.E. Wagner, E. Agura, B.J. Hill, M. Smogorzewska, R.A. Koup, M.R. Betts, R.H. Collins, and D.C. Douek. 2001. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 97:1458-1466.
112. Fukushi, N., H. Arase, B. Wang, K. Ogasawara, T. Gotohda, R.A. Good, and K. Onoe. 1990. Thymus: a direct target tissue in graft-versus-host reaction after

- allogeneic bone marrow transplantation that results in abrogation of induction of self-tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6301-6305.
113. Garvy, B.A., W.G. Telford, L.E. King, and P.J. Fraker. 1993. Glucocorticoids and irradiation-induced apoptosis in normal murine bone marrow B-lineage lymphocytes as determined by flow cytometry. *Immunology* 79:270-277.
 114. Borghesi, L.A., G. Smithson, and P.W. Kincade. 1997. Stromal cell modulation of negative regulatory signals that influence apoptosis and proliferation of B lineage lymphocytes. *J Immunol* 159:4171-4179.
 115. Asma, G.E., R.L. van den Bergh, and J.M. Vossen. 1987. Regeneration of TdT+, pre-B, and B cells in bone marrow after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 43:865-870.
 116. Leitenberg, D., J.M. Rapoport, and B.R. Smith. 1994. B-cell precursor bone marrow reconstitution after bone marrow transplantation. *Am J Clin Pathol* 102:231-236.
 117. Storek, J., R.P. Witherspoon, D. Webb, and R. Storb. 1996. Lack of B cells precursors in marrow transplant recipients with chronic graft-versus-host disease. *Am J Hematol* 52:82-89.
 118. Morrissey, P., K. Charrier, L. Bressler, and A. Alpert. 1988. The influence of IL-1 treatment on the reconstitution of the hemopoietic and immune systems after sublethal radiation. *J Immunol* 140:4204-4210.
 119. Okamoto, T., A. Kanamaru, E. Kakishita, and K. Nagai. 1991. Stromal fibroblastic and hematopoietic progenitors in patients with graft-versus-host disease (GVHD). *Int J Hematol* 54:299-306.
 120. LeBien, T.W. 2000. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 96:9-23.
 121. Mackay, I.R. 2000. Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity. *Bmj* 321:93-96.
 122. Klein, L., and B. Kyewski. 2000. "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J Mol Med* 78:483-494.
 123. Bach, J.F. 2003. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 3:189-198.
 124. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains

- (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
125. Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 184:387-396.
126. Fontenot, J.D., J.L. Dooley, A.G. Farr, and A.Y. Rudensky. 2005. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 202:901-906.
127. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192:295-302.
128. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192:303-310.
129. McHugh, R.S., M.J. Whitters, C.A. Piccirillo, D.A. Young, E.M. Shevach, M. Collins, and M.C. Byrne. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311-323.
130. Huang, C.T., C.J. Workman, D. Flies, X. Pan, A.L. Marson, G. Zhou, E.L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H.I. Levitsky, J.D. Powell, D.M. Pardoll, C.G. Drake, and D.A. Vignali. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21:503-513.
131. Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S.I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and B. Fazekas de St Groth. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203:1693-1700.
132. Liu, W., A.L. Putnam, Z. Xu-Yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, P.A. Gottlieb, P. Kapranov, T.R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D.M. Soper, S.F. Ziegler, and J.A. Bluestone. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203:1701-1711.
133. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.

134. Wing, K., E. Suri-Payer, and A. Rudin. 2005. CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. *Scand J Immunol* 62:1-15.
135. Allan, S.E., S.Q. Crome, N.K. Crellin, L. Passerini, T.S. Steiner, R. Bacchetta, M.G. Roncarolo, and M.K. Levings. 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 19:345-354.
136. Aerts, N.E., E.J. Dombrecht, D.G. Ebo, C.H. Bridts, W.J. Stevens, and L.S. De Clerck. 2008. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 251:109-115.
137. Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paepers, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.
138. Torgerson, T.R., and H.D. Ochs. 2007. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 120:744-750; quiz 751-742.
139. Bennett, C.L., J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance, and H.D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
140. Gambineri, E., T.R. Torgerson, and H.D. Ochs. 2003. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 15:430-435.
141. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
142. Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5138-5143.
143. Zheng, Y., and A.Y. Rudensky. 2007. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 8:457-462.

144. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
145. Bensinger, S.J., A. Bandeira, M.S. Jordan, A.J. Caton, and T.M. Laufer. 2001. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)/25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* 194:427-438.
146. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182:18-32.
147. Thornton, A.M., E.E. Donovan, C.A. Piccirillo, and E.M. Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 172:6519-6523.
148. Shevach, E.M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2:389-400.
149. Mills, K.H. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4:841-855.
150. Wood, K.J., and S. Sakaguchi. 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3:199-210.
151. Zou, W. 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6:295-307.
152. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10:1969-1980.
153. Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296.
154. Tang, Q., J.Y. Adams, A.J. Tooley, M. Bi, B.T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R.M. Locksley, M.F. Krummel, and J.A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 7:83-92.

155. Fallarino, F., U. Grohmann, S. You, B.C. McGrath, D.R. Cavener, C. Vacca, C. Orabona, R. Bianchi, M.L. Belladonna, C. Volpi, P. Santamaria, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 176:6752-6761.
156. Ermann, J., V. Szanya, G.S. Ford, V. Paragas, C.G. Fathman, and K. Lejon. 2001. CD4(+)CD25(+) T cells facilitate the induction of T cell anergy. *J Immunol* 167:4271-4275.
157. Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B.M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali, and R. Clynes. 2008. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 180:5916-5926.
158. Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M.S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204:1303-1310.
159. Kobie, J.J., P.R. Shah, L. Yang, J.A. Rebhahn, D.J. Fowell, and T.R. Mosmann. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 177:6780-6786.
160. Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257-1265.
161. Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193:1303-1310.
162. Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A.H. Enk. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193:1285-1294.
163. Shevach, E.M., R.S. McHugh, C.A. Piccirillo, and A.M. Thornton. 2001. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 182:58-67.

164. Piccirillo, C.A., J.J. Letterio, A.M. Thornton, R.S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara, and E.M. Shevach. 2002. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 196:237-246.
165. Hawrylowicz, C.M., and A. O'Garra. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 5:271-283.
166. Annacker, O., C. Asseman, S. Read, and F. Powrie. 2003. Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis. *J Autoimmun* 20:277-279.
167. Collison, L.W., C.J. Workman, T.T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K.M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R.S. Blumberg, and D.A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569.
168. de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34:2480-2488.
169. Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6:1142-1151.
170. Thornton, A.M., C.A. Piccirillo, and E.M. Shevach. 2004. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol* 34:366-376.
171. Herman, A.E., G.J. Freeman, D. Mathis, and C. Benoist. 2004. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med* 199:1479-1489.
172. Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi, and R.J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174:1783-1786.
173. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
174. Vieira, P.L., J.R. Christensen, S. Minaee, E.J. O'Neill, F.J. Barrat, A. Boonstra, T. Barthlott, B. Stockinger, D.C. Wraith, and A. O'Garra. 2004. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172:5986-5993.

175. Barrat, F.J., D.J. Cua, A. Boonstra, D.F. Richards, C. Crain, H.F. Savelkoul, R. de Waal-Malefyt, R.L. Coffman, C.M. Hawrylowicz, and A. O'Garra. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 195:603-616.
176. Levings, M.K., R. Bacchetta, U. Schulz, and M.G. Roncarolo. 2002. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 129:263-276.
177. Roncarolo, M.G., M. Battaglia, and S. Gregori. 2003. The role of interleukin 10 in the control of autoimmunity. *J Autoimmun* 20:269-272.
178. Maynard, C.L., L.E. Harrington, K.M. Janowski, J.R. Oliver, C.L. Zindl, A.Y. Rudensky, and C.T. Weaver. 2007. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol* 8:931-941.
179. Weiner, H.L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207-214.
180. Chen, Y., V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, and H.L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237-1240.
181. Taylor, P.A., C.J. Lees, and B.R. Blazar. 2002. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 99:3493-3499.
182. Taylor, P.A., R.J. Noelle, and B.R. Blazar. 2001. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 193:1311-1318.
183. Cohen, J.L., A. Trenado, D. Vasey, D. Klatzmann, and B.L. Salomon. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 196:401-406.
184. Jones, S.C., G.F. Murphy, and R. Korngold. 2003. Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD425 T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response. *Biol Blood Marrow Transplant* 9:243-256.

185. Hanash, A.M., and R.B. Levy. 2005. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 105:1828-1836.
186. Joffre, O., N. Gorsse, P. Romagnoli, D. Hudrisier, and J.P. van Meerwijk. 2004. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood* 103:4216-4221.
187. Trenado, A., F. Charlotte, S. Fisson, M. Yagello, D. Klatzmann, B.L. Salomon, and J.L. Cohen. 2003. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* 112:1688-1696.
188. Cooke, K.R., L. Kobzik, T.R. Martin, J. Brewer, J. Delmonte, Jr., J.M. Crawford, and J.L. Ferrara. 1996. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 88:3230-3239.
189. Storek, J., D. Wells, M.A. Dawson, B. Storer, and D.G. Maloney. 2001. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 98:489-491.
190. Zeng, D., D. Lewis, S. Dejbakhsh-Jones, F. Lan, M. Garcia-Ojeda, R. Sibley, and S. Strober. 1999. Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease. *J Exp Med* 189:1073-1081.
191. Nguyen, V.H., R. Zeiser, D.L. Dasilva, D.S. Chang, A. Beilhack, C.H. Contag, and R.S. Negrin. 2007. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* 109:2649-2656.
192. Grass, J.A., T. Wafa, A. Reames, D. Wages, L. Corash, J.L. Ferrara, and L. Lin. 1999. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood* 93:3140-3147.
193. Garvy, B.A., J.M. Elia, B.L. Hamilton, and R.L. Riley. 1993. Suppression of B-cell development as a result of selective expansion of donor T cells during the minor H antigen graft-versus-host reaction. *Blood* 82:2758-2766.

194. Kincade, P.W., G. Lee, C.E. Pietrangel, S. Hayashi, and J.M. Gimble. 1989. Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Annu Rev Immunol* 7:111-143.
195. Pietrangel, C.E., S. Hayashi, and P.W. Kincade. 1988. Stromal cell lines which support lymphocyte growth: characterization, sensitivity to radiation and responsiveness to growth factors. *Eur J Immunol* 18:863-872.
196. Baker, M.B., R.L. Riley, E.R. Podack, and R.B. Levy. 1997. Graft-versus-host-disease-associated lymphoid hypoplasia and B cell dysfunction is dependent upon donor T cell-mediated Fas-ligand function, but not perforin function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1366-1371.
197. Maciejewski, J., C. Salleri, S. Anderson, and N.S. Young. 1995. Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood* 85:3183-3190.
198. Nagafuji, K., T. Shibuya, M. Harada, S. Mizuno, K. Takenaka, T. Miyamoto, T. Okamura, H. Gondo, and Y. Niho. 1995. Functional expression of Fas antigen (CD95) on hematopoietic progenitor cells. *Blood* 86:883-889.
199. Peggs, K.S. 2006. Reconstitution of adaptive and innate immunity following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Cytotherapy* 8:427-436.
200. Storek, J., T. Gooley, R.P. Witherspoon, K.M. Sullivan, and R. Storb. 1997. Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD4 T cell counts. *Am J Hematol* 54:131-138.
201. Storek, J., G. Espino, M.A. Dawson, B. Storer, M.E. Flowers, and D.G. Maloney. 2000. Low B-cell and monocyte counts on day 80 are associated with high infection rates between days 100 and 365 after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 96:3290-3293.
202. Hakki, M., S.R. Riddell, J. Storek, R.A. Carter, T. Stevens-Ayers, P. Sudour, K. White, L. Corey, and M. Boeckh. 2003. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* 102:3060-3067.

203. Ryan, D., S. Kossover, S. Mitchell, C. Frantz, L. Hennessy, and H. Cohen. 1986. Subpopulations of common acute lymphoblastic leukemia antigen-positive lymphoid cells in normal bone marrow identified by hematopoietic differentiation antigens. *Blood* 68:417-425.
204. Caldwell, C.W., E. Poje, and M.A. Helikson. 1991. B-cell precursors in normal pediatric bone marrow. *Am J Clin Pathol* 95:816-823.
205. Stephan, R.P., C.R. Reilly, and P.L. Witte. 1998. Impaired ability of bone marrow stromal cells to support B-lymphopoiesis with age. *Blood* 91:75-88.
206. Small, T.N., C.A. Keever, S. Weiner-Fedus, G. Heller, R.J. O'Reilly, and N. Flomenberg. 1990. B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* 76:1647-1656.
207. Kook, H., F. Goldman, D. Padley, R. Giller, S. Rumelhart, M. Holida, N. Lee, C. Peters, M. Comito, D. Huling, and M. Trigg. 1996. Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children: immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery. *Blood* 88:1089-1097.
208. Golde, D.W., W.G. Hocking, S.G. Quan, R.S. Sparkes, and R.P. Gale. 1980. Origin of human bone marrow fibroblasts. *Br J Haematol* 44:183-187.
209. Gordon, M.Y. 1988. The origin of stromal cells in patients treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 3:247-251.
210. Witherspoon, R.P., L.G. Lum, and R. Storb. 1984. Immunologic reconstitution after human marrow grafting. *Semin Hematol* 21:2-10.
211. Roux, E., C. Helg, B. Chapuis, M. Jeannet, and E. Roosnek. 1992. Evolution of mixed chimerism after allogeneic bone marrow transplantation as determined on granulocytes and mononuclear cells by the polymerase chain reaction. *Blood* 79:2775-2783.
212. Reddy, P., R. Negrin, and G.R. Hill. 2008. Mouse models of bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:129-135.
213. Ferrara, J.L., R. Levy, and N.J. Chao. 1999. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 5:347-356.

214. Stamenkovic, I., and B. Seed. 1988. CD19, the earliest differentiation antigen of the B cell lineage, bears three extracellular immunoglobulin-like domains and an Epstein-Barr virus-related cytoplasmic tail. *J Exp Med* 168:1205-1210.
215. Hakim, F.T., and R.E. Gress. 2002. Reconstitution of thymic function after stem cell transplantation in humans. *Curr Opin Hematol* 9:490-496.
216. Beschorner, W.E., G.M. Hutchins, G.J. Elfenbein, and G.W. Santos. 1978. The thymus in patients with allogeneic bone marrow transplants. *Am J Pathol* 92:173-186.
217. Krenger, W., S. Rossi, L. Piali, and G.A. Hollander. 2000. Thymic atrophy in murine acute graft-versus-host disease is effected by impaired cell cycle progression of host pro-T and pre-T cells. *Blood* 96:347-354.
218. Fry, T.J., and C.L. Mackall. 2005. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future. *Bone Marrow Transplant* 35 Suppl 1:S53-57.
219. Gill, J., M. Malin, J. Sutherland, D. Gray, G. Hollander, and R. Boyd. 2003. Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev* 195:28-50.
220. Gill, J., M. Malin, G.A. Hollander, and R. Boyd. 2002. Generation of a complete thymic microenvironment by MTS24(+) thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 3:635-642.
221. Rossi, S., B.R. Blazar, C.L. Farrell, D.M. Danilenko, D.L. Lacey, K.I. Weinberg, W. Krenger, and G.A. Hollander. 2002. Keratinocyte growth factor preserves normal thymopoiesis and thymic microenvironment during experimental graft-versus-host disease. *Blood* 100:682-691.
222. Hauri-Hohl, M.M., M.P. Keller, J. Gill, K. Hafen, E. Pachlatko, T. Boulay, A. Peter, G.A. Hollander, and W. Krenger. 2007. Donor T-cell alloreactivity against host thymic epithelium limits T-cell development after bone marrow transplantation. *Blood* 109:4080-4088.
223. Kelly, R.M., S.L. Highfill, A. Panoskaltsis-Mortari, P.A. Taylor, R.L. Boyd, G.A. Hollander, and B.R. Blazar. 2008. Keratinocyte growth factor and androgen blockade work in concert to protect against conditioning regimen-induced thymic epithelial damage and enhance T-cell reconstitution after murine bone marrow transplantation. *Blood* 111:5734-5744.

224. Rossi, S.W., L.T. Jeker, T. Ueno, S. Kuse, M.P. Keller, S. Zuklys, A.V. Gudkov, Y. Takahama, W. Krenger, B.R. Blazar, and G.A. Hollander. 2007. Keratinocyte growth factor (KGF) enhances postnatal T-cell development via enhancements in proliferation and function of thymic epithelial cells. *Blood* 109:3803-3811.
225. Foy, T.M., A. Aruffo, J. Bajorath, J.E. Buhlmann, and R.J. Noelle. 1996. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 14:591-617.
226. Kelsoe, G. 1995. In situ studies of the germinal center reaction. *Adv Immunol* 60:267-288.
227. Nguyen, V.H., R. Zeiser, and R.S. Negrin. 2006. Role of naturally arising regulatory T cells in hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:995-1009.
228. Contag, P.R., I.N. Olomu, D.K. Stevenson, and C.H. Contag. 1998. Bioluminescent indicators in living mammals. *Nat Med* 4:245-247.
229. Nguyen, V.H., S. Shashidhar, D.S. Chang, L. Ho, N. Kambham, M. Bachmann, J.M. Brown, and R.S. Negrin. 2008. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Blood* 111:945-953.
230. Martin, F., and J.F. Kearney. 2002. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2:323-335.
231. Rowe, V., T. Banovic, K.P. MacDonald, R. Kuns, A.L. Don, E.S. Morris, A.C. Burman, H.M. Bofinger, A.D. Clouston, and G.R. Hill. 2006. Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 108:2485-2492.
232. Schultz, K.R., J. Paquet, S. Bader, and K.T. HayGlass. 1995. Requirement for B cells in T cell priming to minor histocompatibility antigens and development of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 16:289-295.
233. Iori, A.P., G.F. Torelli, M.S. De Propriis, F. Milano, S. Pupella, M. Gozzer, F. Mancini, M.L. Milani, S. Intoppa, R. Cerretti, B. Lucarelli, V. Valle, L. Malandrucolo, E. Iannella, E. Arleo, A. Guarini, and R. Foa. 2008. B-cell concentration in the apheretic product predicts acute graft-versus-host disease and treatment-related mortality of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation* 85:386-390.

234. Michonneau, D., R. Peffault de Latour, R. Porcher, M. Robin, M. Benbunan, V. Rocha, P. Ribaud, C. Ferry, A. Devergie, V. Vanneaux, E. Gluckman, J.P. Marolleau, G. Socie, and J. Larghero. 2009. Influence of bone marrow graft B lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants. *Br J Haematol* 145:107-114.
235. Kolb, H.J. 2008. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 112:4371-4383.
236. Iwasaki, T., T. Hamano, K. Saheki, T. Kuroiwa, Y. Kataoka, Y. Takemoto, A. Ogata, A. Sugihara, N. Terada, J. Fujimoto, and E. Kakishita. 1999. Effect of graft-versus-host disease (GVHD) on host hematopoietic progenitor cells is mediated by Fas-Fas ligand interactions but this does not explain the effect of GVHD on donor cells. *Cell Immunol* 197:30-38.
237. Welner, R.S., R. Pelayo, and P.W. Kincade. 2008. Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat Rev Immunol* 8:95-106.
238. Cain, D., M. Kondo, H. Chen, and G. Kelsoe. 2009. Effects of acute and chronic inflammation on B-cell development and differentiation. *J Invest Dermatol* 129:266-277.
239. Takenaka, K., K. Nagafuji, M. Harada, S. Mizuno, T. Miyamoto, S. Makino, H. Gondo, T. Okamura, and Y. Niho. 1996. In vitro expansion of hematopoietic progenitor cells induces functional expression of Fas antigen (CD95). *Blood* 88:2871-2877.
240. Miyake, K., I.L. Weissman, J.S. Greenberger, and P.W. Kincade. 1991. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med* 173:599-607.
241. Ryan, D.H., B.L. Nuccie, and C.N. Abboud. 1992. Inhibition of human bone marrow lymphoid progenitor colonies by antibodies to VLA integrins. *J Immunol* 149:3759-3764.
242. Chung, B., D. Min, W.J. Joo, M.R. Krampf, J. Huang, Y. Yang, S. Shashidhar, J. Brown, E.P. Dudl, and K.I. Weinberg. Combined effects of IL-7 and SCF administration on lymphopoiesis after murine bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*
243. Miller, J.P., D. Izon, W. DeMuth, R. Gerstein, A. Bhandoola, and D. Allman. 2002. The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7. *J Exp Med* 196:705-711.

244. Burger, J.A., N. Tsukada, M. Burger, N.J. Zvaifler, M. Dell'Aquila, and T.J. Kipps. 2000. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 96:2655-2663.
245. Burger, J.A., and T.J. Kipps. 2002. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk Lymphoma* 43:461-466.
246. Tudor, K.S., K.J. Payne, Y. Yamashita, and P.W. Kincade. 2000. Functional assessment of precursors from murine bone marrow suggests a sequence of early B lineage differentiation events. *Immunity* 12:335-345.
247. Wright, D.E., E.P. Bowman, A.J. Wagers, E.C. Butcher, and I.L. Weissman. 2002. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med* 195:1145-1154.
248. Visnjic, D., Z. Kalajic, D.W. Rowe, V. Katavic, J. Lorenzo, and H.L. Aguila. 2004. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 103:3258-3264.
249. Zhu, J., R. Garrett, Y. Jung, Y. Zhang, N. Kim, J. Wang, G.J. Joe, E. Hexner, Y. Choi, R.S. Taichman, and S.G. Emerson. 2007. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* 109:3706-3712.
250. Zhang, Q., R. Guo, E.M. Schwarz, B.F. Boyce, and L. Xing. 2008. TNF inhibits production of stromal cell-derived factor 1 by bone stromal cells and increases osteoclast precursor mobilization from bone marrow to peripheral blood. *Arthritis Res Ther* 10:R37.
251. Salvucci, O., M. Basik, L. Yao, R. Bianchi, and G. Tosato. 2004. Evidence for the involvement of SDF-1 and CXCR4 in the disruption of endothelial cell-branching morphogenesis and angiogenesis by TNF-alpha and IFN-gamma. *J Leukoc Biol* 76:217-226.
252. Heinonen, K.M., and C. Perreault. 2008. Development and functional properties of thymic and extrathymic T lymphocytes. *Crit Rev Immunol* 28:441-466.
253. Whitlock, C.A., and O.N. Witte. 1982. Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:3608-3612.

254. Hunt, P., D. Robertson, D. Weiss, D. Rennick, F. Lee, and O.N. Witte. 1987. A single bone marrow-derived stromal cell type supports the in vitro growth of early lymphoid and myeloid cells. *Cell* 48:997-1007.
255. Whitlock, C.A., G.F. Tidmarsh, C. Muller-Sieburg, and I.L. Weissman. 1987. Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule. *Cell* 48:1009-1021.
256. Collins, L.S., and K. Dorshkind. 1987. A stromal cell line from myeloid long-term bone marrow cultures can support myelopoiesis and B lymphopoiesis. *J Immunol* 138:1082-1087.
257. Ogawa, M., S. Nishikawa, K. Ikuta, F. Yamamura, M. Naito, K. Takahashi, and S. Nishikawa. 1988. B cell ontogeny in murine embryo studied by a culture system with the monolayer of a stromal cell clone, ST2: B cell progenitor develops first in the embryonal body rather than in the yolk sac. *Embo J* 7:1337-1343.
258. Izon, D., K. Rudd, W. DeMuth, W.S. Pear, C. Clendenin, R.C. Lindsley, and D. Allman. 2001. A common pathway for dendritic cell and early B cell development. *J Immunol* 167:1387-1392.
259. Kondo, M., D.C. Scherer, T. Miyamoto, A.G. King, K. Akashi, K. Sugamura, and I.L. Weissman. 2000. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* 407:383-386.
260. Sudo, T., M. Ito, Y. Ogawa, M. Iizuka, H. Kodama, T. Kunisada, S. Hayashi, M. Ogawa, K. Sakai, and S. Nishikawa. 1989. Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development. *J Exp Med* 170:333-338.
261. Arber, C., A. BitMansour, T.E. Sparer, J.P. Higgins, E.S. Mocarski, I.L. Weissman, J.A. Shizuru, and J.M. Brown. 2003. Common lymphoid progenitors rapidly engraft and protect against lethal murine cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 102:421-428.
262. Shono, Y., S. Ueha, Y. Wang, J. Abe, M. Kurachi, Y. Matsuno, T. Sugiyama, T. Nagasawa, M. Imamura, and K. Matsushima. 2010. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 115:5401-5411.
263. Woolfrey, A., and C. Anasetti. 1999. Allogeneic hematopoietic stem-cell engraftment and graft failure. *Pediatr Transplant* 3 Suppl 1:35-40.

264. Chen, B.J., X. Cui, G.D. Sempowski, J. Domen, and N.J. Chao. 2004. Hematopoietic stem cell dose correlates with the speed of immune reconstitution after stem cell transplantation. *Blood* 103:4344-4352.
265. Chen, J., K. Lipovsky, F.M. Ellison, R.T. Calado, and N.S. Young. 2004. Bystander destruction of hematopoietic progenitor and stem cells in a mouse model of infusion-induced bone marrow failure. *Blood* 104:1671-1678.
266. Chen, J., J.S. Brandt, F.M. Ellison, R.T. Calado, and N.S. Young. 2005. Defective stromal cell function in a mouse model of infusion-induced bone marrow failure. *Exp Hematol* 33:901-908.
267. Bloom, M.L., A.G. Wolk, K.L. Simon-Stoos, J.S. Bard, J. Chen, and N.S. Young. 2004. A mouse model of lymphocyte infusion-induced bone marrow failure. *Exp Hematol* 32:1163-1172.
268. Xia, G., R.L. Truitt, and B.D. Johnson. 2006. Graft-versus-leukemia and graft-versus-host reactions after donor lymphocyte infusion are initiated by host-type antigen-presenting cells and regulated by regulatory T cells in early and long-term chimeras. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:397-407.
269. Kolb, H.J., A. Schattenberg, J.M. Goldman, B. Hertenstein, N. Jacobsen, W. Arcese, P. Ljungman, A. Ferrant, L. Verdonck, D. Niederwieser, F. van Rhee, J. Mittermueller, T. de Witte, E. Holler, and H. Ansari. 1995. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86:2041-2050.
270. Collins, R.H., Jr., O. Shpilberg, W.R. Drobyski, D.L. Porter, S. Giralt, R. Champlin, S.A. Goodman, S.N. Wolff, W. Hu, C. Verfaillie, A. List, W. Dalton, N. Ognoskie, A. Chetrit, J.H. Antin, and J. Nemunaitis. 1997. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 15:433-444.
271. Johnson, B.D., W.R. Drobyski, and R.L. Truitt. 1993. Delayed infusion of normal donor cells after MHC-matched bone marrow transplantation provides an antileukemia reaction without graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 11:329-336.
272. Johnson, B.D., and R.L. Truitt. 1995. Delayed infusion of immunocompetent donor cells after bone marrow transplantation breaks graft-host tolerance allows for

- persistent antileukemic reactivity without severe graft-versus-host disease. *Blood* 85:3302-3312.
273. Johnson, B.D., E.E. Becker, and R.L. Truitt. 1999. Graft-vs.-host and graft-vs.-leukemia reactions after delayed infusions of donor T-subsets. *Biol Blood Marrow Transplant* 5:123-132.
274. Blazar, B.R., P.A. Taylor, M.W. Boyer, A. Panoskaltsis-Mortari, J.P. Allison, and D.A. Vallera. 1997. CD28/B7 interactions are required for sustaining the graft-versus-leukemia effect of delayed post-bone marrow transplantation splenocyte infusion in murine recipients of myeloid or lymphoid leukemia cells. *J Immunol* 159:3460-3473.

8 Publikationen

Veröffentlichungen

Hoffmann, P., T.J. Boeld, R. Eder, J. Albrecht, **K. Doser**, B. Piseshka, A. Dada, C. Niemand, M. Assenmacher, E. Orso, R. Andreesen, E. Holler, and M. Edinger. Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells for clinical trials. Biol Blood Marrow Transplant. 2006 Mar;12(3):267-74

Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, **Doser K**, Piseshka B, Andreesen R, Edinger M. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon *in vitro* expansion. Blood. 2006 Dec 15;108(13):4260-7

Posterbeiträge

K. Doser, J. Albrecht, T. Boeld, R. Eder, J. Stahl, R. Andreesen, P. Hoffmann and M. Edinger; Impaired B cell reconstitution in GVHD, 4th International Symposium on the Clinical Use of Cellular Products, Regensburg 2007

K. Doser, J. Albrecht, T.J. Boeld, R. Eder, J. Stahl, R. Andreesen, P. Hoffmann and M. Edinger; Protection from graft-versus-host disease by donor CD4+CD25+ regulatory T cells improves B lymphocyte reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation, 37. Annual Meeting of the German Society for Immunology; Sept. 5-8, 2007; Heidelberg

K. Doser, J. Albrecht, T. Boeld, R. Eder, J. Stahl, T. Winkler, R. Andreesen, P. Hoffmann and M. Edinger, Influence of GVHD on B cell reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation, Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, Dgfl), Wien, September 3-6, 2008

K. Doser, J. Albrecht, T. Winkler, R. Andreesen, P. Hoffmann and M. Edinger, Graft-versus-host disease impairs early B lymphopoiesis in the bone marrow, 5th International Symposium on the Clinical Use of Cellular Products, Nuernberg 2009

K. Doser, M. Edinger, B. Echtenacher, P. Hoffmann; Increased susceptibility to fungal infection in recipients with GVHD after allogeneic bone marrow transplantation can be

prevented by transfer of donor CD4+CD25+ regulatory T cells, 40. Annual Meeting of the German Society for Immunology; Sept. 22-25, 2010; Leipzig

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Doser
Vorname: Kristina
Geburtsdatum: 09.04.1980
Geburtsort: Deggendorf, Deutschland
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

09/1986 - 07/1990 Grundschule, Metten
09/1990 - 07/1991 Hauptschule, Metten
09/1991 - 07/2000 Robert-Koch-Gymnasium, Deggendorf
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2000 - 05/2005 Biologiestudium an der Universität Regensburg
Hauptfach: Biochemie
Nebenfach: Zellbiologie und Chemie
Diplomarbeit am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie, Universität Regensburg, bei Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer
Diplomarbeitsthema: „Etablierung eines *in-vitro* Translations-systems für *Pyrococcus furiosus*“
Abschluss: Diplom in Biologie (Note: 1,5)

seit 02/2006 Naturwissenschaftliche Doktorandin am Universitätsklinikum Regensburg, Abteilung Hämatologie und internistische Onkologie
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. Reinhard Andreesen
Arbeitsgruppenleiter: Prof. Dr. Matthias Edinger
Dokarbeitsthema: „Untersuchungen zur B-Zell-Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation“

Zusatzqualifikationen

„Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für Biologische Sicherheit (BBS)“,
Universität Regensburg

Organisation und Betreuung von studentischen Praktika der Universität Regensburg

- Mikrobiologie für Pharmazeuten
- Physiologie für Pharmazeuten

10 Danksagung

An der Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir beim Anfertigen der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Matthias Edinger und PD Dr. Petra Hoffmann für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung der Dissertation und die anregenden Diskussionen, welche die vorliegende Arbeit maßgeblich vorangetrieben haben. Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Andreesen für die Möglichkeit diese Dissertation in der Abteilung Hämatologie/Onkologie anfertigen zu können.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. med. Roland Seifert für die Bereitschaft zur fakultätsinternen Vertretung dieser Dissertation danken, die diese Promotion erst ermöglichte.

Besonders bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Dr. Thomas Schubert, der mir mit seinem pathologischen Fachwissen eine außerordentliche Hilfe bei der Beurteilung histologischer Untersuchungen war.

Ein ganz besonderer Dank gilt jedoch allen aus der Arbeitsgruppe:

Danke Julia für die nette Zusammenarbeit und die große Hilfe im Labor. Mit Dir waren sogar unsere „Nachtschichten“ immer lustig. Ebenso möchte ich mit bei unserer „Pilz-Göttin“ Anna bedanken, die immer ein Auge auf alles im Labor hat und uns reichlich mit allen benötigten Arbeitsmaterialien versorgt. Ein großes Dankeschön geht auch an Jacky (danke für alle „Notfallgespräche“ am Wochenende) und Evi.

Und natürlich geht der Dank auch an alle aus den „hinteren“ beiden Laboren:

Jasmin und Rüdiger (die „Sortmeister“), Monique (du hast von Anfang an einfach zu uns gehört), Janina, Tina, Martina und Leo.

Danke Claudia („Mutti“) für alle Schnitte und Färbungen, die Du für mich gemacht hast.

Auch wenn sie leider nicht mehr bei uns im Labor sind, dürfen sie hier trotzdem nicht vergessen werden: Danke Monika, Jana, Katrin und Eva.

...und natürlich nicht zu vergessen die „Rehli-Mädels“. Danke Maja und Claudi für jede Nespresso-Kapsel, die netten Abende mit Euch und die immer wieder aufmunternden Worte. Ihr seid die besten!!

Zu guter letzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, ohne deren jahrelange Unterstützung das alles nicht möglich gewesen wäre. DANKE FÜR ALLES!!!

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Daten und Konzepte sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den _____

(Kristina Doser)